

**Estudio preliminar de la actividad degradadora a partir de hongos
aislados de muestras de crudo adsorbidas en diferentes fibras
vegetales**

LAURA BEATRÍZ CHAPARRO GIRALDO Cód. 064141095

Trabajo de Grado para optar al título de Ingeniera Ambiental

Director: Patricia Joyce Pamela Zorro Mateus
Química, Msc Bioquímica

Codirector: Sandra Milena Campos Alba
Bióloga, Msc Microbióloga

Universidad Libre

Facultad de Ingeniería

Departamento de Ingeniería Ambiental

Bogotá, 09 de Agosto de 2019

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, mi pilar,

A mi padre, mi guía,

A mi abuela, su infinito apoyo y amor, por creer en mí,

A mi hermano, mi confidente y consejero, por los conocimientos que me ha dado,

A mi hermana, por su entrega.

A mi directora de proyecto, por su total colaboración, dedicación y disposición,

A mi codirectora, por su cooperación y ayuda.

*A ti, J, por estar desde el principio hasta el final en el desarrollo de este proyecto, por
cada palabra de apoyo y aliento dado.*

*Finalmente, a mis amigos y compañeros de universidad, por los días que me
regalaron, sus palabras y su confianza.*

Resumen

En este proyecto cuyo fin era conocer la actividad de degradación de crudo de unas muestras fúngicas, se realizaron pruebas preliminares, en las cuales se buscaba saber el nivel de la actividad de degradación de los aislamientos en el petróleo crudo. Posteriormente, con los mejores resultados, se montaron dos pruebas, la primera fueron las curvas de crecimiento para conocer el comportamiento presentado en esta sustancia por parte de los aislamientos seleccionados, y la segunda, con otros compuestos hidrocarbonados denominados de difícil degradación para conocer su actividad degradadora en otros materiales.

Los métodos y técnicas empleadas fueron la biorremediación, la técnica gravimétrica, el screening longitudinal, las curvas de crecimiento y, la desviación estándar, la t de student y el ANOVA para el análisis estadístico.

La compilación del trabajo realizado, es el resumen de las consultas, investigaciones y prácticas realizadas para la culminación del trabajo de grado llamado “estudio preliminar de la actividad degradadora de crudo a partir de hongos aislados de muestras de crudo adsorbidas en diferentes fibras vegetales” y los resultados aquí presentados.

Palabras claves: hongos, crudo, degradación, pruebas preliminares, curva de crecimiento.

Abstract

In this project, the purpose was to know the activity of degradation of the crude of some fungal samples, were carried out preliminary tests, in which it was sought to know the level of the activity of degradation of the insulations in crude oil. Subsequently, with the best results, two tests were mounted, the first were the growth curves to know the behavior presented in this substance by the selected isolates, and the second, with other hydrocarbon compounds called difficult degradation to know their activity degrader in other materials.

The methods and techniques used were bioremediation, gravimetric technique, longitudinal screening, growth curves and, standard deviation, the Student's t and the ANOVA for statistical analysis.

The compilation of the work carried out is the summary of the consultations, research and practices carried out for the completion of the work degree called "preliminary study of the degradation activity of crude oil from fungi isolated from crude oil samples adsorbed on different plant fibers" and the results specified here.

Keywords: fungi, crude, degradation, preliminary tests, growth curve.

Contenido

INTRODUCCIÓN.....	6
1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.....	12
2. JUSTIFICACIÓN INICIAL O PRELIMINAR	15
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. OBJETIVO GENERAL	17
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. MARCO REFERENCIAL	18
4.1 Antecedentes.....	18
4.2 Marco Teórico.....	21
4.3 Marco Conceptual.....	26
5. DISEÑO METODOLÓGICO	40
5.1 Aislamiento y caracterización de hongos obtenidos a partir de muestras de crudo adsorbido en matrices vegetales.	40
5.2 Evaluación de la actividad degradadora de crudo por parte de los hongos aislados de las fibras vegetales con crudo adsorbido.....	42
5.3 Biodegradación de otros materiales orgánicos de difícil degradación por parte de los aislamientos fúngicos.....	43
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45

6.1 Aislamiento y caracterización de hongos obtenidos a partir de muestras de crudo adsorbido en matrices vegetales.	45
Las muestras de hongos que crecieron en los recipientes que contenían las fibras vegetales que habían adsorbido crudo, fueron sembradas en las cinco matrices y en los tres medios de cultivo comentados, hasta lograr su purificación.	45
6.2 Evaluación de la actividad degradadora de crudo por parte de los hongos aislados de las fibras vegetales con crudo adsorbido.....	71
6.3. Biodegradación de otros materiales orgánicos derivados del petróleo crudo por parte de los aislamientos fúngicos.....	86
7. CONCLUSIONES.....	92
8. RECOMENDACIONES.....	95
9. Bibliografía.....	97
10. ANEXOS.....	109

Contenido de Tablas

Tabla 1. Tipos de petróleo.....	25
Tabla 2. Hongos capaces de degradar hidrocarburos	25
Tabla 3. Diferencias entre las células Procariotas y células Eucariotas	28
Tabla 4. Características presentes en los dominios Archaea, Bacteria y Eukarya.....	28
Tabla 5. Tiempo de degradación de los residuos.....	37
Tabla 6. Caracterización macroscópica y microscópica del género <i>Acremonium</i> sp	46
Tabla 7. Caracterización macroscópica y microscópica del género <i>Aspergillus</i> sp.....	51
Tabla 8. Caracterización macroscópica y microscópica del género <i>Botrytis</i> sp	53
Tabla 9. Caracterización macroscópica y microscópica del género <i>Chaetomium</i> sp	55
Tabla 10. Caracterización macroscópica y microscópica del género <i>Mucor</i> sp	57
Tabla 11. Caracterización macroscópica y microscópica del género <i>Penicillium</i> sp.	59
Tabla 12. Caracterización macroscópica y microscópica del género <i>Phialophora</i> sp ...	61
Tabla 13. Caracterización macroscópica y microscópica del género <i>Rhodotorula</i> sp.	62
Tabla 14. Asignación de géneros a los aislamientos realizados	63
Tabla 15. Procedencia de los aislamientos realizados en las cinco matrices y en los tres medios dispuestos	67
Tabla 16. Comparación entre los valores obtenidos de masa del aislamiento LC para la curva de crecimiento mostrada en la figura 13. Valor P obtenido de la prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales con un nivel de significancia de 0,05.....	75
Tabla 17. Comparación entre los valores obtenidos de masa del aislamiento BsBH para la curva de crecimiento mostrada en la figura 13. Valor P obtenido de la prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales con un nivel de significancia de 0,05.....	78

Contenido de Figuras

Figura 1. Clasificación de los dominios biológicos.	27
Figura 2. Estructuras principales de los hongos.....	32
Figura 3. Curva de crecimiento de los hongos	36
Figura 4. Clave taxonómica del género <i>Acremonium</i> sp.	46
Figura 5. Clave taxonómica del género <i>Aspergillus</i> sp.....	50
Figura 6. Clave taxonómica del género <i>Botrytis</i> sp.	53
Figura 7. Clave taxonómica del género <i>Chaetomium</i> sp.	54
Figura 8. Clave taxonómica del género <i>Mucor</i> sp.	56
Figura 9. Clave taxonómica del género <i>Penicillium</i> sp.	58
Figura 10. Clave taxonómica del género <i>Phialophora</i> sp.	61
Figura 11. Clave taxonómica del género <i>Rhodotorula</i> sp.....	62
Figura 12. Gráfico de barras comparativo entre los resultados de la prueba preliminar de degradación de crudo.....	72
Figura 13. Curva de crecimiento del aislamiento LC	80
Figura 14. Curva de crecimiento del aislamiento BsBH	82
Figura 15. Gráfico de barras comparativo entre los resultados de la prueba de degradación de otros hidrocarburos de difícil degradación	87

Contenido de anexos

Anexo 1. Tabla de datos de las pruebas preliminares de degradación de crudo (datos correspondientes a la figura 12).....	109
Anexo 2. Tabla de datos del crecimiento de los blancos de cada aislamiento realizado en las pruebas preliminares de degradación de crudo (datos correspondientes a la figura 12).....	110
Anexo 3. Tabla de datos de crecimiento del aislamiento LC para la construcción de la curva de crecimiento (datos correspondientes a la figura 13).....	111
Anexo 4. Tabla de datos del crecimiento de los blancos del aislamiento LC para la construcción de la curva de crecimiento (datos correspondientes a la figura 13).....	111
Anexo 5. Tabla de datos del crecimiento del aislamiento BsBH para la construcción de la curva de crecimiento (datos correspondientes a la figura 14).	112
Anexo 6. Tabla de datos del crecimiento de los blancos del aislamiento BsBH para la construcción de la curva de crecimiento (datos correspondientes a la figura 14).....	112
Anexo 7. Tabla de datos de la pérdida de masa de otras matrices (datos correspondientes a la figura 15).....	113
Anexo 8. Tabla de datos de la masa inicial añadida para cada matriz (datos correspondientes a la figura 15).....	114
Anexo 9. Tabla de datos del crecimiento del blanco de los aislamientos puestos a prueba en las pruebas con otras matrices (datos correspondientes a la figura 15).....	114

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos sustancias compuestas principalmente de carbono e hidrógeno, han sido empleados por siglos en la construcción del desarrollo de la vida humana tal y como se conoce, generando una dependencia a este tipo de compuestos, al formar parte de la materia prima para la elaboración de diferentes objetos como ropa, muebles, electrodomésticos, combustible, polímeros, entre otros (Blanco, 2015). Por lo tanto, la cantidad de materiales en los que se encuentra este tipo de compuestos responde a una gran suma y con esto, a una cantidad de residuos y contaminantes importantes. A esto, se le suma el hecho de que muchos de los materiales realizados con estos compuestos son denominados de difícil degradación; esto significa que su descomposición natural emplea periodos de tiempo demasiado largos para poder llevarse a cabo. Por lo que es necesario emplear métodos externos para degradar estos materiales o ayudar a que su descomposición sea más rápida. El uso de esos métodos puede involucrar sustancias o recursos en exceso o pueden causar de forma colateral algún efecto poco deseado para el medio; por lo que, se decidió emplear la técnica de biorremediación con el fin de utilizar elementos propios de la naturaleza que ayudasen a eliminar estas sustancias contaminantes con la menor cantidad de efectos negativos para el ambiente. Los organismos seleccionados para este proyecto fueron los hongos, respondiendo a unas muestras fúngicas que crecieron en recipientes donde se encontraban dos tipos de fibras vegetales en algunas, *Luffa cylindrica* y en otras Bagazo de caña, las cuales habían absorbido petróleo crudo.

Con los tres elementos centrales para llevar a cabo la investigación, se tuvo como fin último, conocer qué tipo de hongos pueden ayudar en la biorremediación de sustancias hidrocarbonadas, y con esto, disminuir su tiempo de degradación con la ayuda de estos organismos; y de este modo, contribuir con la descontaminación de estas sustancias en los diversos medios de una forma natural, empleando menos recursos y capital y generando una menor cantidad de sustancias tóxicas para el ambiente. En el desarrollo de la investigación, se clasificaron diecinueve aislamientos diferentes, dentro de ocho géneros reconocidos: *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Botrytis* sp., *Chaetomium* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Phialophora* sp., y *Rhodotorula* sp. Dentro de estos aislamientos, se seleccionaron seis, los cuales se pusieron en pruebas preliminares con petróleo crudo y según el resultado observado en estas, fueron seleccionados los mejores resultados para conocer su comportamiento en curvas de crecimiento y en otros materiales hidrocarbonados.

1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

El crudo, es uno de los hidrocarburos más importantes, debido a que forman parte de la materia prima para la elaboración de múltiples productos usados diariamente. La función que se le ha dado es tan extensa, que se ha vuelto necesaria la búsqueda de nuevas fuentes, donde se pueda extraer para su aprovechamiento, aún bajo el conocimiento de que no es un recurso renovable (M.H., Guillen, & Abreu, 2016). El uso excesivo de este fluido, ha llevado a la generación de problemas ambientales como la remoción de la cobertura vegetal y desplazamiento de hábitats naturales, sobre-explotación de yacimientos, contaminación por derrames, emisiones de gases y partículas, subproductos y residuos tóxicos (Patín, 2013).

El derrame y contaminación del crudo en los diferentes ecosistemas y medios, generan importantes conflictos debido a que las características de esta sustancia como, su densidad, polaridad, presión de vapor, cantidad vertida y salinidad (Ortínez, Ize, & Gavilán, 2003) aportan al impacto y al desequilibrio del suelo, el agua y el aire, lo que a su vez, genera cambios bióticos y abióticos y, riesgo a la salud pública (Roy, y otros, 2014).

La problemática en los diversos ambientes, no se genera solo por el petróleo, sino también por otros compuestos hidrocarbonados en los cuales, se emplea el crudo como una de las sustancias primas para su elaboración. Una gran parte de estos compuestos, son denominados de difícil degradación debido a que requieren de varios años para que se puedan descomponer (Lalucat, Cladera, & García, 2015).

Algunos de estos compuestos hidrocarbonados de difícil degradación son las gomas, el caucho, el diésel y el poliestireno, en los cuales es necesario que los agentes que se usan para la remediación, rompan las cadenas dobles y triples de los enlaces que componen estos materiales y sus ramificaciones, para lograr la desestabilización en su estructura carbonada y la posterior detoxificación y degradación (Hernández, Rubiños, & Alvarado, 2004).

Las consecuencias que han generado estos hidrocarburos en el medio ambiente, han hecho que se establezca la necesidad de remediar la contaminación causada por estas sustancias. Este procedimiento se puede realizar mediante técnicas físicas, químicas, térmicas, eléctricas y biológicas o bien, la combinación de algunas de estas (Li, Li, Song, & Guo, 2018). La selección de la técnica empleada, se lleva a cabo según la evaluación del método más oportuno, a partir de la afectación a los recursos naturales, la sustancia contaminante y sus productos secundarios, la disponibilidad y nivel de conocimiento del recurso humano, socio-ambientales y económicos y la relación espacio-tiempo (Janbandhu & Fulekar, 2011).

Una de las técnicas más populares actualmente es la remediación de tipo biológica, debido a tres razones principales (Jiménez, 2017) (Castells, 2012):

1. La tecnología implicada en este proceso es menos costosa que la que se utiliza en otros tratamientos físicos y químicos.
2. No requiere el empleo de agentes químicos que puedan producir daños colaterales al ambiente.
3. Transforman los agentes que se quieren degradar en sustancias inocuas o en unas menos tóxicas y por ende menos peligrosa para el ambiente.

Por lo anterior, se puede decir que la biorremediación minimiza la alteración al balance natural de los diferentes sistemas y los daños que se puedan ocasionar en materia económica o social a las diversas comunidades que puedan obtener un provecho en forma de bien o servicio de estos medios (Garzón, Rodríguez, & Hernández, 2017).

Entre los organismos empleados para la remediación de los diferentes ambientes están los hongos, aunque su uso no es tan extendido y conocido en técnicas de remediación como el de las bacterias. Los hongos pueden ser preferibles para estrategias de biorremediación debido a factores como menor proliferación y mayor estabilidad genética. Así mismo, son eficaces debido a características propias como la resistencia y capacidad de sobrevivir en un medio donde no tienen una amplia gama de nutrientes, junto a la tolerancia que tienen para estar en un medio con pH entre 4 a 6.5 (Torres & Zuluaga, 2009). Por lo anterior, estos organismos son agentes propicios para la remediación de hidrocarburos por su estabilidad y adaptación a medios con nutrientes limitados para su alimentación y bajo regímenes de salinidad que le confieren al medio diversas sales.

Por lo anterior, la pregunta que busca resolver este proyecto es si los hongos que crecieron en las muestras de crudo adsorbido en dos matrices vegetales son capaces de degradar crudo y algunos materiales derivados del petróleo de difícil degradación.

2. JUSTIFICACIÓN INICIAL O PRELIMINAR

Los graves problemas ambientales que ha traído el uso extendido y desmedido de los hidrocarburos, ha llevado a la búsqueda de procesos que ayuden a mitigar los daños causados al ambiente. Debido a que estos problemas se han ocasionado por la inclusión de sustancias exógenas que mal usadas han causado grandes problemas ambientales, se ha visto la necesidad de encontrar alternativas naturales para mejorar los diversos medios sin llegar a tener una afectación a los mismos.

Hay una importante variedad de hongos que tienen la capacidad de degradar compuestos hidrocarbonados; pero dentro de estos se conoce que el filo Ascomycetes del dominio fungi es en el que mayor variedad de especies se distinguen con esta capacidad degradadora en sustancias hidrocarbonadas. Algunas especies conocidas correspondientes a esta clasificación son: *Aspergillus* sp., *Amorphoteca* sp. *Fusarium* sp., *Graphium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., y *Talaromyces* sp. (Varjani, 2017).

En el presente proyecto se realizó un estudio preliminar acerca de la capacidad de adaptación que tienen determinadas muestras de hongos para permanecer en un ambiente contaminado con crudo y con algunos materiales derivados del petróleo denominados de difícil degradación y con ello, aprovechar las diferentes sustancias que los componen, para crecer en el medio. Los aislamientos fúngicos probados, provinieron de muestras de un trabajo de grado realizado en la Universidad Libre en el que crecieron estos organismos de manera accidental, sobre crudo adsorbido en diferentes fibras vegetales, para así, conocer si las cepas fúngicas que se estudiaron tenían la capacidad de emplear compuestos hidrocarbonados y de este modo realizar un posible estudio

sobre el uso que pueden tener estos hongos al descomponer crudo u otros hidrocarburos de difícil degradación para llevarse a cabo la remediación en diversas zonas contaminadas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Comprobar la capacidad de degradación de crudo por parte de aislamientos de hongos provenientes de muestras de crudo adsorbidas sobre fibras vegetales como una alternativa para la mitigación de la contaminación por éste y sus derivados.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar morfológicamente las cepas fúngicas provenientes de las muestras de crudo adsorbidas sobre fibras vegetales.
- Estudiar la actividad degradadora de crudo de las cepas fúngicas aisladas, como un primer acercamiento a su uso en biorremediación.
- Determinar si algunas de las cepas estudiadas muestran actividad degradadora en otros materiales orgánicos derivados del petróleo que constituyen residuos de difícil degradación.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1 Antecedentes

Los organismos vivos como objeto principal de las técnicas de biorremediación, han sido estudiados de acuerdo a sus características y potencialidades en la degradación y detoxificación de diferentes compuestos, llevándose a cabo investigaciones sobre sus requerimientos nutricionales, sus potenciales y efectividad de degradación, los mecanismos por los cuales degradan los contaminantes, el tiempo de degradación, la interacción y aprovechamiento de los recursos del medio en el que subsisten, entre otros, lo que ha llevado a conocer los posibles usos en los que se pueden emplear para beneficio de las actividades humanas (Varjani, 2017).

Los organismos más empleados han sido las bacterias y los hongos; dentro de estos dos grupos, las bacterias son las que mayor atención han recibido por parte de los investigadores; sin embargo, en los últimos años ha habido un importante interés en el estudio de los hongos; debido a que, según la subdivisión en la clasificación de los organismos, los hongos tienen diferencias que los hacen propicios para degradar con mayor potencialidad uno u otro compuesto. Lozano (2005) afirma lo anterior al decir que los hongos son capaces de degradar entre el 6% al 80% de hidrocarburos según su clase al ser capaces de usar estos como su sustrato.

En las últimas cinco décadas aproximadamente, el desarrollo de las técnicas de biorremediación ha implementado nuevos métodos y tecnologías, las cuales han ayudado en la evolución de la investigación de estos organismos, frente a sus

capacidades de remediación y en la reducción del tiempo en que se lleva a cabo este proceso (Rodríguez & Sanchez, 2003).

Debido a que las bacterias han sido el organismo central de esta técnica, muchas de las investigaciones realizadas sobre las potencialidades de degradación de sustancias contaminantes por parte de otros organismos como los hongos se han acompañado con la acción de degradación de bacterias e incluso con plantas debido a las diferentes simbiosis que se forman entre los reinos existentes y la ventaja de estas (Cruz & Alcalá, 2007). A continuación, se nombrarán algunas de las investigaciones que han dado resultados importantes acerca de la utilidad que los hongos pueden tener en la descontaminación de diversos ambientes.

En (2002), Rivera, Ferrera, Volke, Rodríguez & Fernández publicaron una investigación en la que se deseaba conocer la degradación de petróleo en la rizosfera de los pastos alóctono alemán y nativo cabezón, mediante la acción de 46 hongos. Los resultados mostraron a los géneros *Aspergillus* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. y *Trichoderma* 1 y 2 capaces de degradar el contaminante. La población fúngica tolerante al petróleo mostró un efecto positivo en la degradación del crudo, aumentando en razón de nueve veces, para el pasto cabezón. El petróleo fue usado como fuente de energía para el crecimiento de los organismos, evidenciando la capacidad adaptativa que poseen al medio.

En (2006), Hernández, Gutiérrez, Rubiños & Alvarado llevaron a cabo una investigación sobre la remediación de un suelo tipo Fluvisol dystico a partir del uso de plantas y organismos que crecían naturalmente en esa zona, el suelo se

encontraba contaminado con petróleo y estaba ubicado en el estado de Veracruz, México. Se tomaron nueve zonas como punto de muestreo de la rizosfera y se evaluaron las características propias tanto químicas como físicas del suelo junto con la cantidad de Hidrocarburos de Petróleo Totales. Dentro de estos puntos de muestreo, hubo tres en los que creció la planta *Panicum* sp., y junto a esta, la mayoría de las colonias fúngicas. Las condiciones propicias para que estos organismos crecieran en esas zonas fueron la capacidad de sobrevivir en medios ácidos, la presencia de micorrizas en las plantas y su relación con los hongos, en la que mutuamente se aportan nutrientes necesarios para sobrevivir, crecer y aumentar su población y el tipo de partícula del suelo. Dentro de esta investigación, se encontró que la arena es la mejor textura para que se lleve a cabo la biorremediación (Hernandez, Gutiérrez, Rubiños, & Alvarado, 2006).

En (2011), García, junto con demás colaboradores, publicaron una investigación sobre el uso de residuos como el bagazo de caña de azúcar y la cachaza en un suelo contaminado con crudo, en esta investigación, se midieron los Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP), los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) y los organismos presentes. Se manejaron relaciones suelo:residuo de 98:2, 96:4 y 94:6. Los mejores resultados se dieron bajo la prueba de bagazo (98:2) con un porcentaje de 60.1% de remoción de HTP y con cachaza (96:4) con una remoción del 43% de HAP. Bajo la observación de la degradación de los hidrocarburos, se observó el aumento de bacterias y hongos que ayudaron en la detoxificación del crudo y a su vez al crecimiento de la flora y estos al consumo del fósforo. En esta investigación se señala

que la presencia de fósforo en el medio ayuda de forma considerable a la biodegradación del crudo.

4.2 Marco Teórico

El eje central del actual proyecto consistió en la acción que pueden llevar a cabo los hongos como agentes degradantes de sustancias hidrocarbonadas para la remediación de diversos ambientes.

En la antigüedad, los hongos se divisaban de tres formas: como organismos generadores de pérdidas económicas al ser varias de sus especies consideradas como plagas para los cultivos, como parásitos generadores de enfermedades y por las comunidades indígenas como organismos con capacidades curativas; pero, a través de los años y después de cuantiosas investigaciones se dio a conocer que estos organismos también pueden causar los efectos contrarios a las dos primeras premisas; es decir, de la misma forma en que son plagas en algunas plantas y parásitos que causan enfermedades, son biorreguladores de organismos que acaban con diferentes cultivos y también de algunos que causan enfermedades a las personas (Mier, Toriello, & Ulloa, 2002).

Luego, se descubrió la capacidad de su uso en la producción de alimentos, antibióticos y pesticidas (Money, 2016), (Zhao, y otros, 2019). Pero en los últimos años su uso más amplio se ha remontado a la degradación de metales pesados y a la biotecnología médica y ambiental (Samakshi & Kuila, 2019), (Arenas, 2014).

Debido a su gran potencial, los hongos se han empleado en gran medida en técnicas de biorremediación. Varjani (2017) dice que “la biorremediación es una técnica innovadora,

en la cual los microorganismos mitigan, degradan o reducen los contaminantes orgánicos peligrosos a compuestos inocuos como CO₂, CH₄, H₂O y biomasa sin afectar negativamente el medio ambiente”.

Las acciones que llevan a cabo los organismos en las sustancias contaminantes para neutralizar su toxicidad son: degradación, conjugación, detoxificación y activación (Smith, 2004). Estas posibles alternativas de reacción con una sustancia hacen que en muchas ocasiones si no se conoce con exactitud el resultado se lleven a cabo pruebas piloto o se realicen de forma *ex situ* para no comprometer el ambiente en el que se va a tratar, de lo contrario las técnicas se implementan de forma *in situ*.

En la biorremediación, los organismos absorben las sustancias orgánicas usándolas como fuente de carbono y energía para su crecimiento, mientras que reciclan las inorgánicas (Varjani, 2017). Éstos llevan a cabo reacciones de mineralización en donde si la reacción es completa, el contaminante es transformado dando como resultado los productos CO₂ y H₂O (Ron & Rosenberg, 2014).

Los organismos necesitan de nutrientes esenciales para poder sobrevivir y reproducirse en un medio, dentro de estos se encuentran elementos como el oxígeno, el nitrógeno, el magnesio, el carbono, entre otros para aumentar su población y llevar a cabo sus funciones básicas (Omokhagbor, Prekeyi, Samson, & Igelenyah, 2015). Martin, Gonzales & Blanco (2004) señalan que si dentro de los contaminantes, se encuentran “altas concentraciones de metales, compuestos orgánicos con alta proporción de cloro o sales inorgánicas”, los organismos se ven afectados por la alta toxicidad que estos compuestos tienen. Aunque muchos metales puedan afectar a los diversos organismos, estos también son capaces de reducir elementos hasta su estructura química más sencilla,

evitando las consecuencias que traen la formación y reacción de sustancias más complejas y por lo tanto, más tóxicas para los ambientes (Martín, González, & Blanco, 2004).

Sin embargo, no todos los organismos son capaces de aprovechar, consumir o degradar todos los sustratos que se encuentran en el medio; para el caso de los hidrocarburos, (Obafemi, Taiwo, Omodara, Dahunsi, & Oranusi, 2018), y Solanas (2009) señalan las características necesarias para que ocurran los procesos de oxidación de hidrocarburos por medio de organismos específicos:

1. Poseer un grupo específico de enzimas capaces de oxidar el hidrocarburo (oxigenasas).
2. Tener la capacidad de usar el contaminante como sustrato para permitir el crecimiento de los organismos.
3. Capacidad de emulsionar con el hidrocarburo.
4. Poseer un mecanismo interno capaz de permitir la adhesión del organismo con la sustancia contaminante.
5. La degradación deja de ser efectiva o requiere de mecanismos externos si el contaminante posee más de 28 carbonos o si su cadena es cíclica.
6. Capacidad de sobrevivir en un medio hidrofóbico.

Debido a la variada diferencia de composición del petróleo, los mecanismos de degradación de crudo no son el mismo para los diferentes tipos de petróleo. A continuación, se explicará grosso modo el mecanismo que emplean para llevar a cabo la degradación del fluido según García M. (2005):

- Hidrocarburos nafténicos y parafínicos: la ruta de degradación de estos hidrocarburos comienza en la oxidación de un grupo metilo generalmente terminal a alcohol, pasando por el grupo cetona, aldehído y ácido carboxílico. Posteriormente, el compuesto se convierte a un ácido graso, el cual sigue una degradación normal por la ruta de la β -oxidación.
- Hidrocarburos asfálticos: la degradación de estos compuestos se lleva a cabo mediante los compuestos químicos catecol y protocatecuato, los cuales, desestabilizan los hidrocarburos aromáticos para hacer posible que las enzimas dioxigenasas ataquen estos compuestos y se pueda proceder a la degradación.

Sabiendo que la acción que realizan los organismos es la de aprovechar el medio en el que subsisten y así aumentar su población al consumir distintas sustancias presentes en el ambiente, bien sea de forma aerobia o anaerobia (Greenpeace, 2009), se hablará a continuación sobre el principal compuesto que se someterá a pruebas de degradación para el actual proyecto, el petróleo.

Speight (2014) dice que: “el petróleo crudo es una mezcla de compuestos de hidrocarburos gaseosos, líquidos y sólidos que se producen en depósitos de rocas sedimentarias en todo el mundo y contiene pequeñas cantidades de compuestos que contienen nitrógeno, oxígeno y azufre, así como cantidades traza de constituyentes metálicos”. El petróleo y sus derivados, puede variar en cuanto a su uso debido a la composición que tengan estos, de igual modo dependiendo del tipo de sustancia hidrocarbonada que sea, los organismos pueden ser o no ser capaces de degradarlo.

Speight y Shafik (2018), comentan que según el cambio anteriormente mencionado de la composición de esta sustancia, existe una diversa variedad en la gravedad (calculada

como grados API), en el punto de ebullición y en la viscosidad; determinando el cambio en la calidad y uso que se le da al petróleo y a sus derivados.

En la tabla 1, se muestra una forma de clasificación de los diferentes tipos de petróleo con sus características propias:

Tabla 1
Tipos de Petróleo

Tipo	Densidad	Estado	Viscosidad	Color	Contenido de Azufre	Productos
Nafténico (formación cíclica de enlaces)	Media	Líquido	Espeso	Oscuro	Bajo	Gasolina
Parafínico (cadenas lineales y ramificadas)	Liviano	Gaseoso	Fluido	Claro	Bajo	Solventes y lubricantes
Asfálticos (hidrocarburos tipo aromáticos)	Pesado	Sólido	Viscoso	Negro	Alto	Asfalto, brea y aceite combustible

Fuente: Adaptado de Pineda (2010). La química aplicada y la elaboración del petróleo colombiano.

Martin, Gonzales & Blanco (2004) comentan que los organismos tienen la capacidad de “utilizar derivados del petróleo como fuente de carbono y muchos de ellos producen surfactantes, que pueden emulsionar los aceites en el agua y facilitar su eliminación”. Lo anterior, es una alternativa y una ventaja favorable en el uso de organismos, pues estos surfactantes naturales terminan siendo “inocuos y biodegradables” (Martín, González, & Blanco, 2004). En la tabla 2 se muestran algunos de los hongos conocidos que son capaces de degradar compuestos de hidrocarburos.

Tabla 2
Hongos capaces de degradar hidrocarburos

Clase	Género	Especie	Compuesto capaz de degradar
Ascomicetos	<i>Beauveria</i>	<i>Alba</i>	Hidrocarburos saturados y aromáticos
Ascomicetos	<i>Candida</i>	<i>Tropicalis</i>	Petróleo

Euteromicetos	<i>Penicillium</i>	<i>Simplicissimum</i>	Hidrocarburos saturados y aromáticos
Basidiomycota	<i>Pleurotus</i>	<i>Ostreatus</i>	Polinucleos aromáticos
Ascomicetos	<i>Saccharomyces</i>	sp.	Petróleo

Fuente: Adaptado de Valderrama Brenda (2000). Microbiología del petróleo y sus derivados.

4.3 Marco Conceptual

En el empleo controlado de organismos es de vital importancia el uso de los nutrientes, sustancias, medios y ambientes, los cuales se proporcionaron en las pruebas de laboratorio para procurar que los resultados obtenidos estuviesen estrechamente correlacionados con las condiciones proporcionadas. De esta forma, es necesario tener una total claridad de los elementos, métodos y técnicas que se usaron para llevar a cabo esta investigación.

1. Especie:

Según Macías y otros (2019), una especie es “una población que tiene un grupo ancestral en común, un metabolismo celular semejante y presenta homogeneidad genética y similitud fenotípica general en sus rasgos morfológicos y fisiológicos y que pueden producir descendencia fértil”.

2. Dominios

La clasificación de los microorganismos, es llevada a cabo por medio de las diferencias estructurales y funcionales que cada organismo tiene. En la figura 1 se muestra la forma de clasificación biológica de los organismos. Se dice que todos los organismos vivos nacieron a partir de un mismo ascendiente, y que de este nacieron los tres tipos de dominios: Archaea, Bacteria y Eukarya. Archaea y Bacteria pertenecientes a las células tipo procariotas, pero a pesar de descender del mismo linaje, se diferenciaron debido a

los procesos metabólicos que llevan a cabo; por su parte, el dominio Eukarya, se dividió en tres reinos, todos de un mismo ancestro eucariótico unicelular, estos son las plantas, los hongos y los animales (Sadava, Heller, Orians, Purves, & Hillis, 2009).

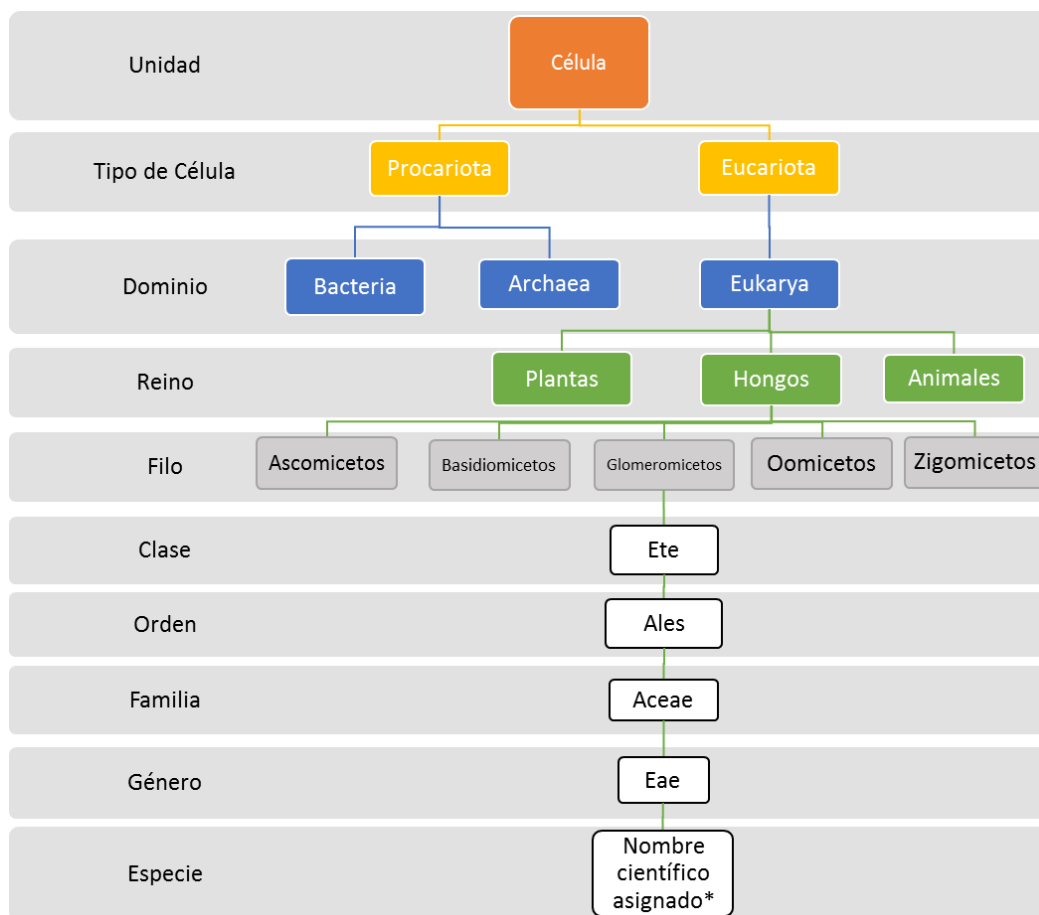


Figura 1. Clasificación de los dominios biológicos.

Fuente: adaptado de Tortora, Funke & Case (2007). Introducción a la microbiología.

Para el caso de la figura 1, desde el segmento clase hasta el de especie, los nombres corresponden al sufijo de cada categoría por grupo taxonómico en los cinco tipos de filo existentes. Los nombres de una especie de organismos se asignan de acuerdo con la descripción física de estos organismos, el lugar donde habitan o el nombre de la persona que lo descubrió.

3. Características taxonómicas

La forma más conocida de clasificación de los organismos es llevada a cabo a partir de las diferencias taxonómicas de estos. En la tabla 3 se presentan las diferencias que existen entre las células procariotas a las cuales pertenecen los dominios archaea y bacteria; y eucariota a la que pertenece el dominio Eukarya.

Tabla 3

Diferencias entre las células Procariotas y células Eucariotas

	Procariotas	Eucariotas
Forma de reproducción	Fisión binaria	Mitosis
Núcleo	Sin núcleo delimitado	Núcleo delimitado por membrana
Estructura	No poseen los orgánulos citoplasmáticos propios de la delimitación de la membrana nuclear	No poseen plegamientos ni sistemas fotosintéticos de la membrana plasmática

Fuente: Adaptado de Sadava, Heller, Orians, Purves & Hillis (2009). Vida la ciencia de la biología.

Por otro lado, en la tabla 4 se muestran algunas de las características principales que diferencian a los tres dominios:

Tabla 4

Características presentes en los dominios Archaea, Bacteria y Eukarya

Características	Archaea	Bacteria	Eukarya
Tipo de lípidos de la membrana	Unión éster	Unión éster	Unión éster
Tipo de Ribosomas	70S	70S	80S
Cantidad de RNA Polimerasa	1	1	3
Metanogénicos	Si	No	No
Nitrificadores	Si	Si	No

Fuente: Adaptado de Sadava, Heller, Orians, Purves & Hillis (2009). Vida la ciencia de la biología.

4. Hongos:

Son un tipo de organismos que se caracterizan por no poseer clorofila, tallos, hojas ni las llamadas raíces verdaderas. Son saprofitos, heterotróficos y parásitos. Hacen parte de las células eucariotas filamentosas que al agruparse forman micelios, los cuales sirven para conectar los nutrientes presentes en el suelo, además de ser una pieza importante en el ciclaje de nutrientes como C y N. Son capaces de descomponer materia orgánica y residuos de difícil degradación (Boullosa, 2010).

4.1 Requerimientos nutricionales esenciales de los hongos:

Los hongos, necesitan ciertos elementos químicos para vivir, crecer y desarrollarse, dentro de estos, se encuentran los siguientes macro-elementos: carbono (obtenido generalmente en forma de polisacáridos), oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre, fósforo, potasio y magnesio. Por otro lado, necesitan micro-elementos como el hierro, zinc, cobre, manganeso, molibdeno y Galio; junto con proteínas y grasa (García V. , 2004) & (Gallardo, 2004).

4.2 Requerimientos físicos de los hongos:

El desarrollo efectivo de las especies fúngicas, comenta Cepero, Restrepo, Franco, Cardenas, & Vargas (2012) se determina por las siguientes condiciones:

- a. Oxígeno: Es un requerimiento esencial para la mayoría de los hongos, pues su naturaleza tiende a ser aerobia, por lo que, sin ésta no pueden subsistir.
- b. Temperatura: la temperatura en la que las especies fúngicas pueden sobrevivir es variada, pues dentro de la clasificación de estos organismos, se encuentran hongos mesófilos, termófilos y psicrófilos. Los hongos pueden crecer en

temperaturas más bajas a 0°C hasta 62°C. Su temperatura óptima esta entre los 22°C y los 37°C según su especie.

- c. pH: los hongos son bastante resistentes a la variación del pH, pues la mayoría se pueden encontrar en medios con pH desde 2 – 9, aunque el pH óptimo para llevar a cabo sus funciones es ácido, de 5.6.
- d. Humedad: los hongos, pueden crecer en ambientes poco húmedos, sin embargo, los hongos crecen de forma óptima en un ambiente con un buen porcentaje de humedad.
- e. Luz: puede ser un requisito esencial para el crecimiento de algunos hongos, mientras que para el crecimiento de otros no es un factor primordial. Sin embargo, para que los hongos se reproduzcan de forma óptima, es necesario que reciban la radiación solar.
- f. Concentración de solutos encontrados en el medio: los hongos tienen la capacidad de sobrevivir en medios en los que se encuentra una alta concentración de sales o de azúcares.

4.3 Identificación morfológica de los hongos.

Los hongos, comprenden diversas especies que se diferencian en su estructura, fisiología y forma de reproducción. Actualmente hay alrededor de 50.000 de estos organismos que se reconocen (Lazcano, 2014).

La clasificación de los hongos se rige por el tipo de micelios que los componen. Fernández, y colaboradores (2009) indicaron la clasificación de estos:

- Ascomicetos: es la especie de hongos con mayor cantidad de organismos conocidos, son tanto terrestres como acuáticos. Este tipo de hongos tienden a

formar líquenes. Cuentan con tabiques perforados y micelios con paredes de separación definida. Su reproducción puede llevarse a cabo de forma sexual o asexual. La reproducción sexual, cuentan con unos ascos en los cuales se encuentran las ascosporas. La reproducción asexual, por su lado, se lleva a cabo por conidios.

A su vez se dividen en las siguientes especies:

- a. Euascomicetos: son especies con estructura fructífera, son los organismos que se reproducen mediante ascocarpos.
 - b. Hemiascomicetos: hacen parte de este grupo los ascomicetos que carecen de ascocarpos.
- Basidiomycota: al igual que los ascomicetos, los Basidiomycota tienen micelios con paredes de separación definida e hifas con tabiques perforados. Tienen células binucleadas. Se reproducen de forma sexual por meiosis mediante estructuras denominadas basidiocarpos (célula encontrada en el extremo de las hifas), o asexual mediante esporas llamadas conidias.
 - Glomeromicetos: son organismos únicamente terrestres. Tienden a formar micorrizas arbusculares. Su reproducción se lleva a cabo de forma asexual, sus hifas son cenocíticas; se diferencian de los demás grupos principalmente porque no poseen micelios interconectados. Debido a su forma de reproducción, estas forman estructuras complejas como lo son los acérvulos.
 - Oomicetos: son organismos únicamente acuáticos. Su reproducción puede ser tanto sexual como asexual. En el caso de la reproducción sexual, se realiza mediante oosperas flageladas, produciéndose gametangios femeninos y

masculinos y finalmente una división de origen mitótico. Dentro de las especies de hongos, esta es de la que menos se conoce, con alrededor de 1000 especies conocidas.

- Zigomicetos: son organismos mayoritariamente terrestres. Esta especie, no produce células flageladas, durante su ciclo de vida solo generan una célula diploide. Poseen hifas cenocíticas y su reproducción ocurre mediante zigosporas. Su apariencia, generalmente no es la de un cuerpo carnoso. Un ejemplo de este tipo de hongos es el moho de pan (*Rhizopus* sp.).

Las estructuras principales que se identifican para realizar la caracterización de muestras fúngicas y, con esta, la aproximación en la clasificación de las diferentes categorías existentes y mostradas en la Figura 1 del dominio Eukarya son:

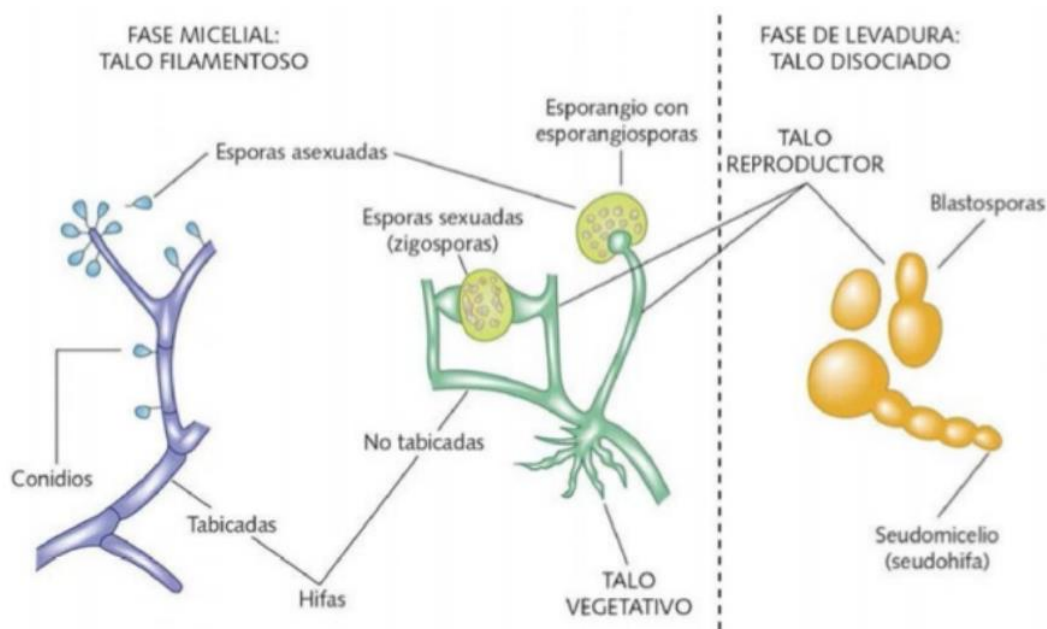


Figura 2. Estructuras principales de los hongos

Fuente: tomado de Arenas (2014). Micología Médica Ilustrada

A continuación se describirá brevemente la función de estas estructuras según Arenas (2014):

Talo: esta formación, se encarga del desarrollo estructural y nutrición de la parte reproductora. Según el crecimiento que desarrolle el talo, se forman las colonias.

Hifas: son tubos formados por una pared celular rígida, los cuales conforman la estructura del cuerpo de los hongos. Por estos, fluye el protoplasma y los núcleos transportando el material genético de los hongos. Las hifas pueden ser tabicadas, o no tabicadas. La unión de las hifas forma el micelio.

Esporas: órgano sexual de los hongos. Pueden ser sexuales o asexuales.

5. Aislamiento de hongos

El aislamiento será necesario para obtener los organismos fúngicos sin otro agente presente. Mondino (2012) indica que este procedimiento se puede realizar comúnmente de tres formas: siembra por estría en placa, vertido en placa y extensión en placa.

5.1. Siembra por estría en placa

Este procedimiento consiste en la separación progresiva del organismo objeto, mediante el agotamiento de una serie de estrías superficiales en la siembra; esto se lleva a cabo generalmente en cuatro cuadrantes, con el fin de separar la especie y obtener un cultivo puro (Gamazo, López, & Díaz, 2010).

5.2. Vertido en placa

Se basa en la dilución de organismos en distintos tubos con diferentes concentraciones, luego una alícuota de estas se pone en las cajas de Petri y se

esparce. En este, se puede evaluar el crecimiento de cada muestra mediante el conteo de estos organismos (Mondino, 2012).

5.3. Extensión en placa

Se realiza una suspensión concentrada repartida en una cantidad determinada de tubos de ensayo, el 0.1% de la dilución, se siembra en las cajas de Petri y se esparce con un rastrillo de vidrio. El número mínimo para el conteo de colonias en esta técnica, es de 30 (Mondino, 2012).

6. Curva de crecimiento

Para evaluar el crecimiento de un organismo, se realiza una curva de crecimiento en la que se mide el incremento de las cepas fúngicas expresadas como el aumento de la biomasa con respecto al tiempo. La curva de crecimiento tiene cuatro fases las cuales se pueden observar gráficamente en la Figura 2. Hernández A. (2003) menciona estas fases:

- De Latencia: en esta fase, los organismos comienzan un periodo de adaptación, en el que usan la energía que se encuentra en el medio para la síntesis de enzimas que permitan degradar la sustancia contaminante. En esta fase, se dice que no hay crecimiento aparente de las especies fúngicas, pues como la energía que usan en esta fase es para adaptarse, el crecimiento es nulo o poco.
- Logarítmica: es la fase en la que ocurre el mayor crecimiento de biomasa de los hongos, en esta, aprovechan los elementos que componen la sustancia contaminante para incrementar su población fúngica. Esta fase log, Hernández (2003), que termina cuando: “los nutrimentos se agotan, las condiciones

ambientales indispensables para la célula se modifican o cuando la célula produce metabolitos tóxicos o inhiben su reproducción”.

- Estacionaria: en esta fase, ocurre un bajo crecimiento micelial, la velocidad de reproducción de algunos organismos se hace igual a la velocidad de muerte de los restantes.
- De Muerte: esta fase ocurre por dos factores, la disminución y agotamiento de nutrientes esenciales para que los organismos puedan desarrollarse en el medio o bien, la producción de sustancias que son tóxicas para las especies fúngicas.

Estas cuatro fases del comportamiento de los hongos, aunque se presenta en la mayoría de los casos, no siempre ocurre estrictamente en la forma en que se describió anteriormente, en varias ocasiones, la curva puede solo presentar dos fases, una en la que se da inicialmente solo el crecimiento de los organismos y seguida a esta el detenimiento del crecimiento de estos (Arias & Piñeros, 2008). Otro tipo de curva que se puede presentar, es una curva con comportamiento diáuxico, en la que los hongos, se encuentran en presencia de dos o más tipos de sustratos generando de esta forma dos o más fases de crecimiento logarítmico (Cardona, Osorio, & Quintero, 2009).

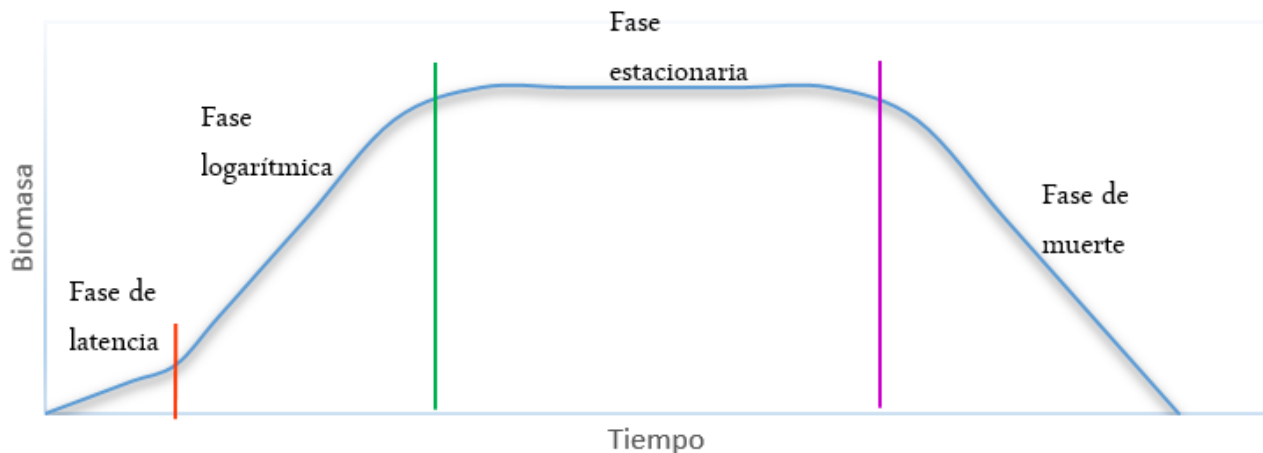


Figura 3. Curva de crecimiento de los hongos

Fuente: adaptado de Hernández A. (2003). Microbiología industrial.

7. Medio Mínimo de Sales

El Medio Mínimo de Sales (MMS), hace referencia a las sales mínimas que necesita un organismo para subsistir, estas sales compuestas por distintos elementos químicos varían según el tipo de organismo empleado. En el caso de los hongos, los elementos más importantes para su subsistencia son el hierro, el zinc, el cobre y en la mayor parte de los casos el oxígeno (Gimeno, 2002).

8. Residuos de difícil degradación

Son residuos que debido a los elementos que lo componen requieren de varios años o incluso décadas para lograr una reducción parcial significativa o total por vías naturales. Estos residuos son en general polímeros como el icopor. Por lo general, se componen de sustancias tóxicas peligrosas para la salud humana (Khan, y otros, 2017).

La clasificación de los residuos, se puede realizar de acuerdo al origen del que proceden:

- a. Agrícolas: son los restos de los cultivos o los residuos orgánicos procedentes de actividades agrícolas. Dentro de estos encontramos la paja y las cascarras.

- b. Forestales: se generan a partir de las actividades de limpieza, mantenimiento o del aprovechamiento de los recursos forestales. Dentro de estos recursos se encuentran la madera y el follaje.
- c. Industriales: son aquellos que se generan en los procesos de transformación y producción de un bien. Algunos de estos residuos son escombros, cenizas, vidrio, poliestireno expandido y llantas.

Dentro de estos tres grupos, los residuos considerados de difícil degradación se presentan principalmente en los residuos de tipo industrial.

En la tabla 5, se muestran algunos de estos residuos y el tiempo que tardan en degradarse en el ambiente.

Tabla 5
Tiempo de degradación de los residuos

Residuo	Tiempo de degradación
Papel	Meses a 1 año
Gomas	5 años
Lata de Aluminio	80 a 200 años
Botella de Plástico	450 años
Vidrio	1'000.000 años

Fuente: Adaptado de Castells & Velo (2012) & Duarte (2010).

La degradación de sustancias se puede realizar mediante los siguientes tipos de biorremediación.

9. Tipos y técnicas de biorremediación

En la implementación de las metodologías de biorremediación, se han desarrollado dos procesos para el desarrollo de tecnologías que pueden dar como resultado la degradación efectiva y eficaz de los contaminantes; Volke (2002) y Chaudhary & Kim (2019) explican estas metodologías:

- a. Biorremediación tipo *in situ*: son técnicas que se realizan en el mismo lugar en donde ocurrió la contaminación del medio, está, se puede llevar a cabo de dos formas:
 - i. Bioaumentación: en esta, se realiza la adición de organismos necesarios para llevar a cabo la degradación efectiva del contaminante. Los organismos pueden ser propios o distintos a los presentes en el medio contaminado o pueden ser organismos genéticamente modificados y especializados en la degradación del contaminante.
 - ii. Bioestimulación: se lleva a cabo la adición de los nutrientes necesarios para que la población microbiana autóctona aumente y descontamine el medio.

En la biorremediación *in situ*, se implementan las siguientes tecnologías:

- Bioventeo: se realiza una inyección de aire para suministrar a los organismos el oxígeno requerido para promover la actividad microbiana.
- Biolabranza: en este proceso se realiza el arado del suelo con el que se permite la ventilación del mismo y por lo tanto la estimulación microbiana.

- Atenuación natural: aunque no es una tecnología propiamente dicha, en este proceso actúan los actores naturales encontrados en el medio contaminado mediante factores fisicoquímicos y acciones biológicas para reducir la concentración de contaminantes. Se realizan procedimientos de modelamiento de la velocidad con la que los organismos en sus ambientes naturales degradan los contaminantes.
- b. Biorremediación tipo *ex situ*: en esta técnica, se realizan pruebas de degradación del contaminante en un régimen controlado de laboratorio, su ventaja se encuentra en que el proceso de remediación es corto y los subproductos de la remediación son controlados, pero su implementación es más costosa. Dentro de esta técnica se encuentran los siguientes tipos de tecnología:
 - Composteo: en una pila, se mezcla el material contaminado con sólidos biodegradables que aportan nutrientes esenciales para el crecimiento de los organismos y así, la degradación del contaminante.
 - Biorreactores: se efectúa la degradación de los contaminantes mediante la combinación de procesos fisicoquímicos y biológicos de forma controlada y segura.

El conjunto de conceptos que se manejaron en el actual proyecto, permitió el análisis de las posibles aplicaciones en las que puede incurrir el uso de organismos como lo son los hongos para la biorremediación de hidrocarburos en los diversos ambientes.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

El tipo de investigación que se realizó fue experimental, debido a que, a lo largo de todo el proyecto, el producto dependió en todo momento de los resultados que se observaron en cada prueba, a continuación, se explicarán los procedimientos realizados para conseguir la finalidad de la investigación.

Las muestras que se usaron en el presente proyecto, provenían de unos recipientes, los cuales contenían petróleo crudo con dos fibras vegetales, en algunos, se encontraba *Luffa cylindrica* y en otras, bagazo de caña. En los que, al cabo de unos meses se observó la presencia de organismos fúngicos que habían crecido en los recipientes. A partir de este suceso, se pensó hacer uso de estas muestras debido a la aparente adaptación que presentaron en el medio; sin embargo, dicha adaptación podría deberse al uso y aprovechamiento del petróleo y/o a las fibras vegetales como sustrato para su crecimiento; por lo que, se puso a prueba los hongos aislados de estas muestras con el fin de conocer si eran capaces de adaptarse al crudo, consumirlo y con ello, descontaminar el medio.

Por lo anterior, se planteó como primer objetivo para conocer esta hipótesis, la caracterización de las cepas de los hongos provenientes de la muestra de crudo. Para llevar a cabo esta caracterización, se realizaron cuatro actividades secuenciales:

5.1 Aislamiento y caracterización de hongos obtenidos a partir de muestras de crudo adsorbido en matrices vegetales.

5.1.1 Aislamiento de hongos a partir de muestras de crudo adsorbido en matrices vegetales

Se tomaron porciones del crudo adsorbido en las fibras vegetales en las que había crecimiento de forma evidente los hongos y se sembraron de la siguiente forma: *Luffa* contaminada (L) y bagazo contaminado (B), siendo éstas dos, muestras de matrices vegetales que habían adsorbido crudo y, bagazo solo (Bs), bagazo hidrolizado (BH) y *Luffa* sola (Ls). Cada muestra, se sembró en tres medios diferentes: Czapeck Dox agar, agar extracto de malta (AEM) y agar-papa dextrosa (PDA). Posteriormente, los morfotipos que crecieron en las diferentes distribuciones comentadas anteriormente, se fueron sembrando en placas del mismo medio hasta lograr su aislamiento (iguales características morfológicas: micelio, color, esporulación, entre otras).

5.1.2. Caracterización morfológica

Con ayuda de las claves de Domsch y Gams (2007), se llevó a cabo la caracterización de estructuras taxonómicas para la identificación de los morfotipos aislados. Esta actividad se hizo mediante la tinción con azul de lactofenol y la observación de la muestra teñida al microscopio, con el fin de identificar las estructuras morfológicas distintivas del género al que pertenecían. Luego, se realizó una revisión bibliográfica sobre el tipo de uso que se le da a las especies que se tienen, con un enfoque a la búsqueda de sustancias que se conozca, puedan degradar.

5.2 Evaluación de la actividad degradadora de crudo por parte de los hongos aislados de las fibras vegetales con crudo adsorbido

El segundo objetivo es estudiar la actividad degradadora de crudo de las cepas fúngicas aisladas. Para esto, se hicieron pruebas preliminares en las que se inoculó el hongo en un medio mínimo de sales compuesto por K_2HPO_4 (0,5 g), KH_2PO_4 (0,04 g), NaCl (0,1 g), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,002 g), $(NH_4)_2SO_4$ (0,2 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,02 g), $FeSO_4$ (0,001 g) (Khan, y otros, 2017) y las concentraciones en porcentaje (p/v) de petróleo crudo más empleadas en la bibliografía consultada (15%, 10%, 5%, 2%, 1% y 0%) (Latha & Kalaivani, 2012), (Yuan, Zhang, Chen, Kong, Liu, & Shen, 2018), (Gao, Zhang, Lai, & Xue, 2017). Estas pruebas se incubaron por 4 semanas a temperatura ambiente y con agitación de 160 rpm. Pasado este tiempo se filtraron al vacío, se lavaron con pequeñas porciones de xileno y etanol para retirar los residuos de crudo y se secaron a 60 °C por 72 horas, pasado este tiempo se pesaron hasta masa constante (Hamzah, Manikan, & Fathiha, 2017).

5.2.1 Curvas de crecimiento

Se seleccionaron las muestras fúngicas que mejor resultado mostraron en las pruebas preliminares de degradación y se dispusieron bajo los mismos parámetros establecidos en estas, con el porcentaje de crudo que mejor resultado mostraron y con concentraciones de crudo de 0%; además, se corrieron blancos en los que se incubó el MMS con crudo y sin hongo. Para el montaje de estos ensayos se partió de un cultivo monospórico, el cual se obtuvo dispersando las esporas de un trozo del cultivo aislado en una solución de Tween 80 al 0.1% obteniendo una dispersión homogénea, de esta se

hizo conteo de esporas usando la cámara de Neubauer y se realizaron las diluciones pertinentes hasta alcanzar una dispersión de esporas con concentración de 1 espora/ μL . De esta dispersión se sembró 1 μL por campo en una caja de Petri dividida en 3X3 cuadros, este medio se incubó por 3 días a 25°C y de estos cultivos se tomó la colonia monospórica con un sacabocado y se sembró en un tubo Falcón con 20 mL de MMS y el porcentaje (%) adecuado de crudo. Posteriormente, los tubos se incubaron a 20°C y 150 rpm de agitación; de estos, se tomaron 3 tubos cada 7 días para determinar la masa ganada por el hongo en este tiempo y construir la curva de crecimiento.

5.3 Biodegradación de otros materiales orgánicos de difícil degradación por parte de los aislamientos fúngicos

El tercer objetivo, consistió en determinar si las cepas estudiadas mostraron actividad degradadora en otros materiales orgánicos que constituyen residuos de difícil degradación.

Este objetivo se realizó siguiendo el procedimiento de las pruebas preliminares hechas usando petróleo crudo, pero esta vez se usaron cinco materiales que contienen sustancias denominadas de difícil degradación como única fuente de carbono: llanta (estireno – butadieno SBR), icopor (poliestireno expandido), pañal (polietileno y polipropileno), nylon (poliamida) y espuma (poliuretano); con el fin de ampliar la información sobre las sustancias que estos hongos pueden degradar y comparar su potencial en cada una de ellas. Adicionalmente, se midió de forma indirecta la posible degradación que los hongos pudieron llevar a cabo en las matrices, por medio de la masa perdida por cada uno de los materiales probados. Los hongos fueron incubados por

cuatro semanas en MMS con 3,6 g de llanta; 0,39 g de nylon; 0,5 g de icopor; 0,2 g de espuma y 0,075 g de pañal; con agitación a 160 rpm. Pasado este tiempo, se filtraron y secaron los materiales probados con las mismas condiciones que en el crudo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento y caracterización de hongos obtenidos a partir de muestras de crudo adsorbido en matrices vegetales.

6.1.1 Aislamiento de hongos a partir de muestras de crudo adsorbido en matrices vegetales

Las muestras de hongos que crecieron en los recipientes que contenían las fibras vegetales que habían adsorbido crudo, fueron sembradas en las cinco matrices y en los tres medios de cultivo comentados, hasta lograr su purificación. El total de las muestras aisladas en los medios fueron diecinueve, estas se purificaron e identificaron según sus características macroscópicas como color, textura, dispersión en el medio, forma, entre otras; junto a la caracterización microscópica realizada con ayuda de tinción con azul de lactofenol.

6.1.2. Caracterización morfológica

Una vez realizado el aislamiento de las muestras obtenidas de los recipientes, se realizó la caracterización morfológica de los morfotipos con ayuda de las claves taxonómicas de Domsch y Gams (2007), como se muestra en las figuras 4 a 11 en las cuales, se encuentran las estructuras microscópicas características de cada uno de los géneros clasificados. La clasificación de los aislamientos en el posible género correspondiente; se muestran en las tablas 6 a 13.

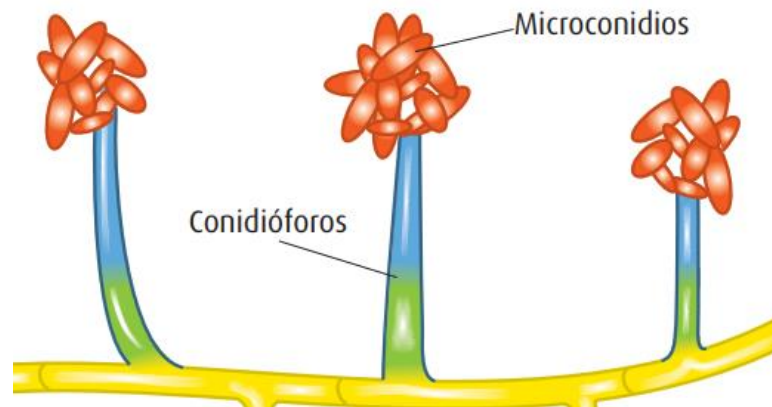


Figura 4. Clave taxonómica del género *Acremonium* sp.

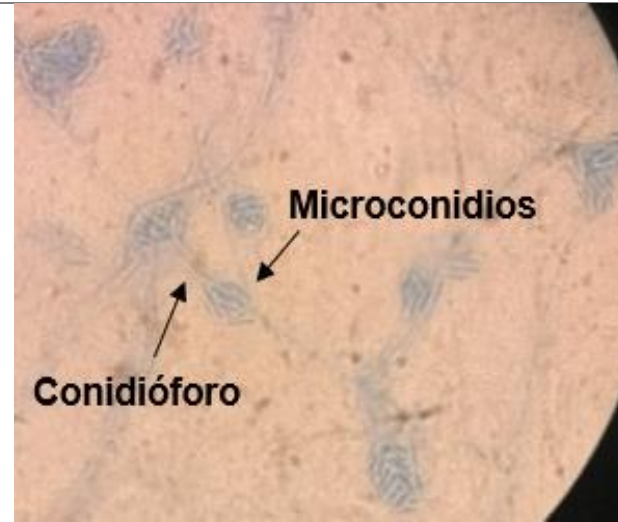
Tomado de (Bonifaz, 2012). Micología médica básica.

Tabla 6

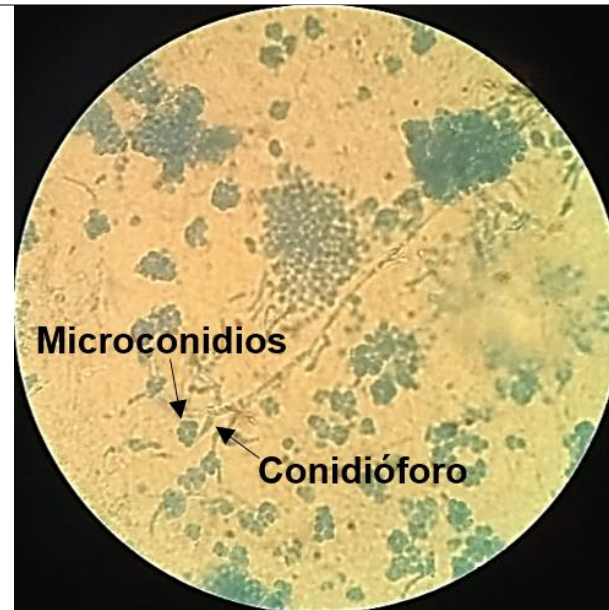
Caracterización macroscópica y microscópica del género *Acremonium* sp.

Nombre Asignado	Imagen Macroscópica	Imagen Microscópica
BA		<p>Conidióforo</p> <p>Microconidio</p>

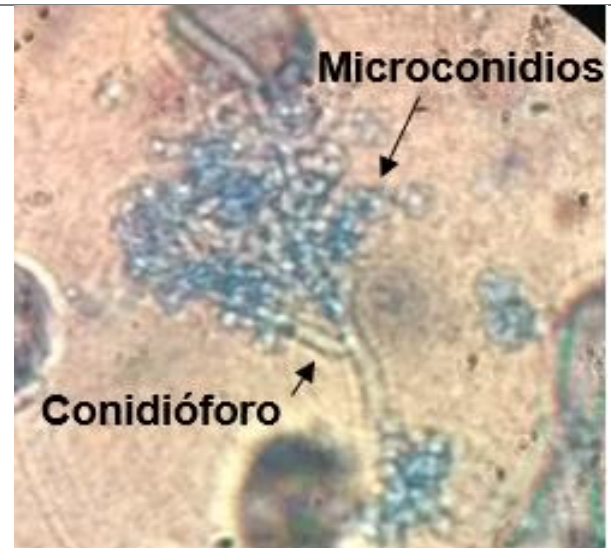
LCo



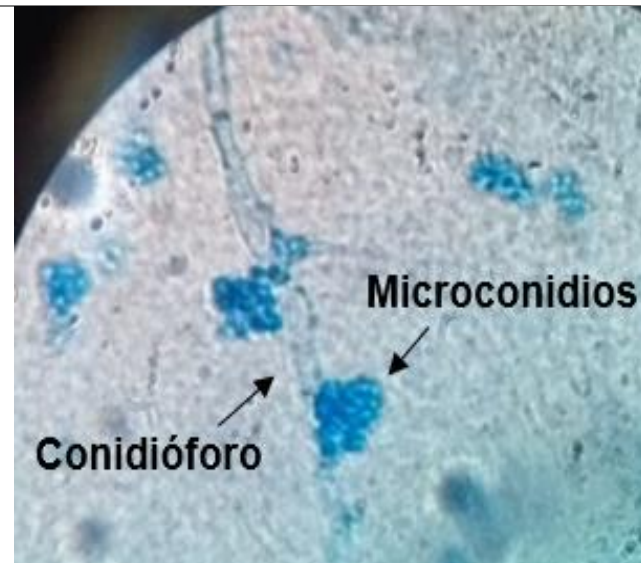
LVA



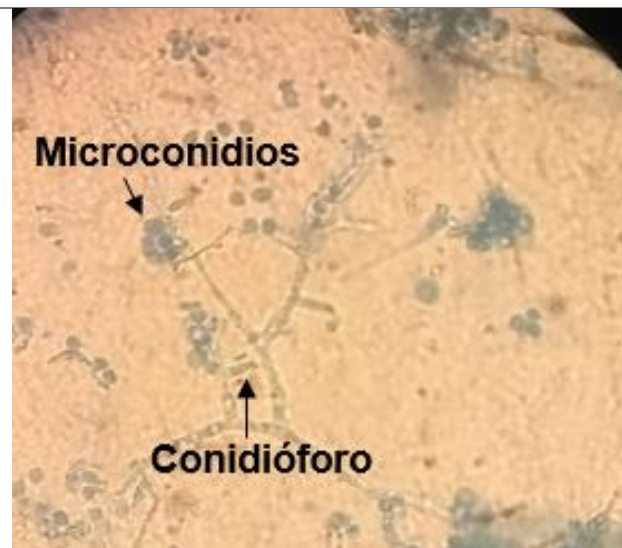
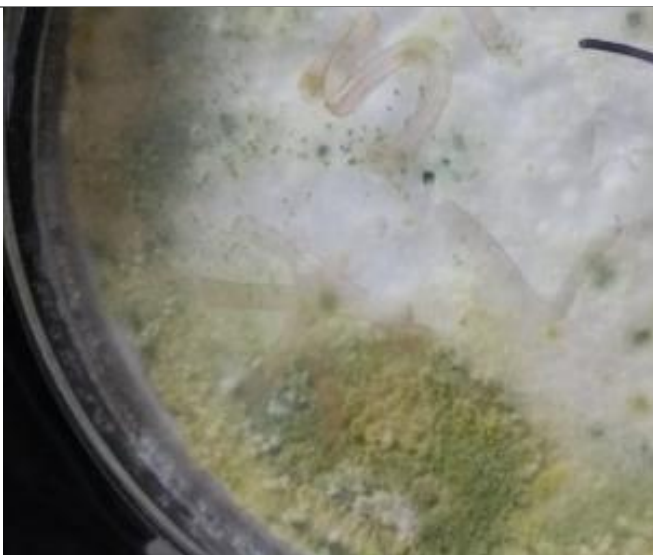
LVP



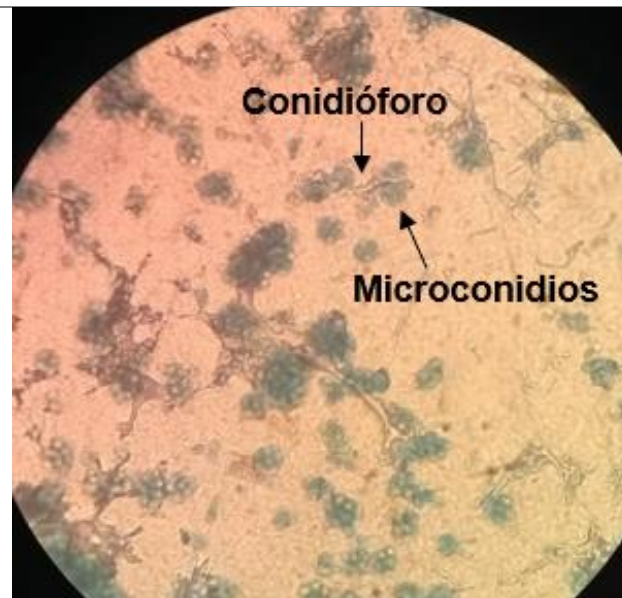
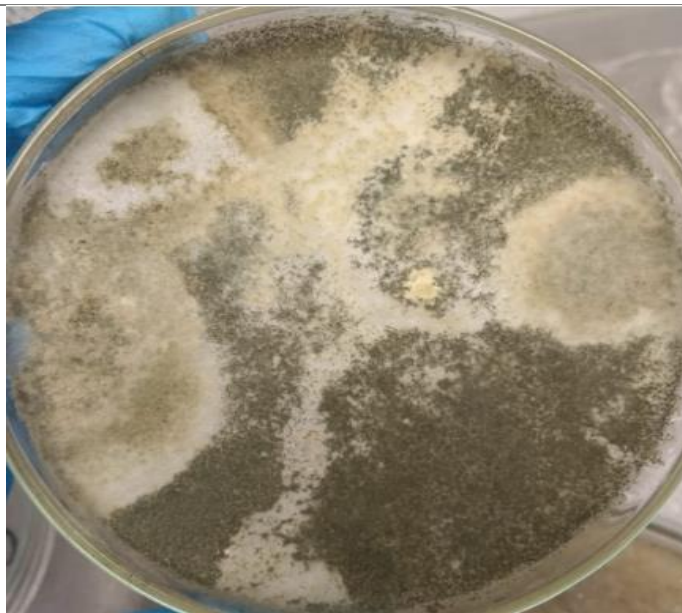
LsN



LsVA



LsVd



Fuente: autora del proyecto.

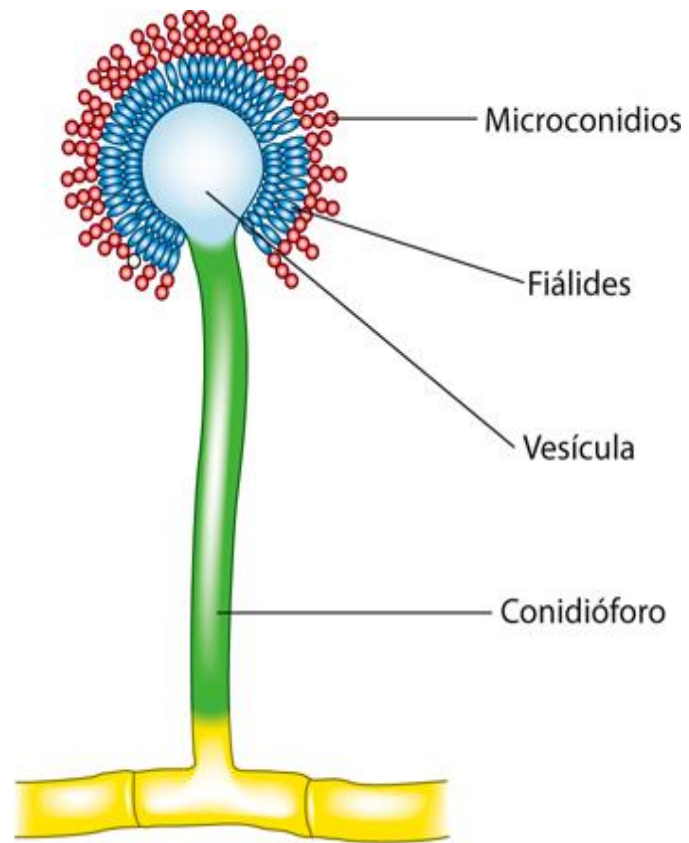

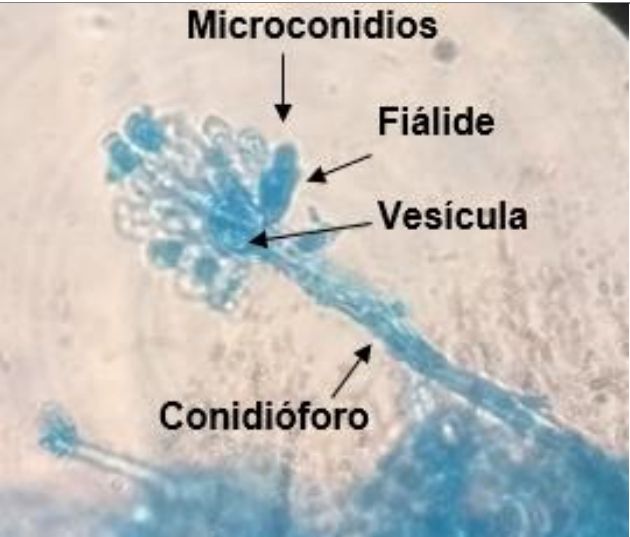
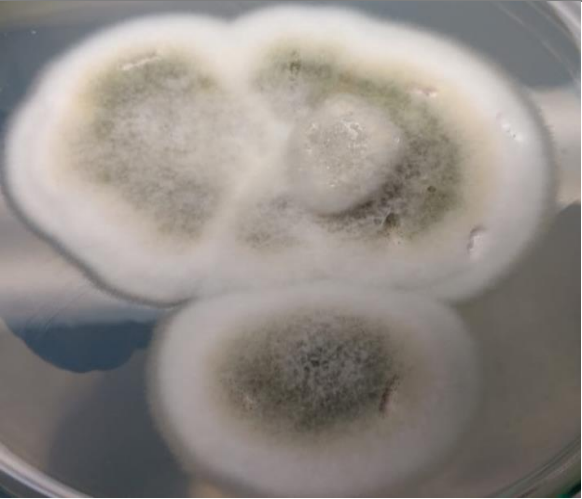
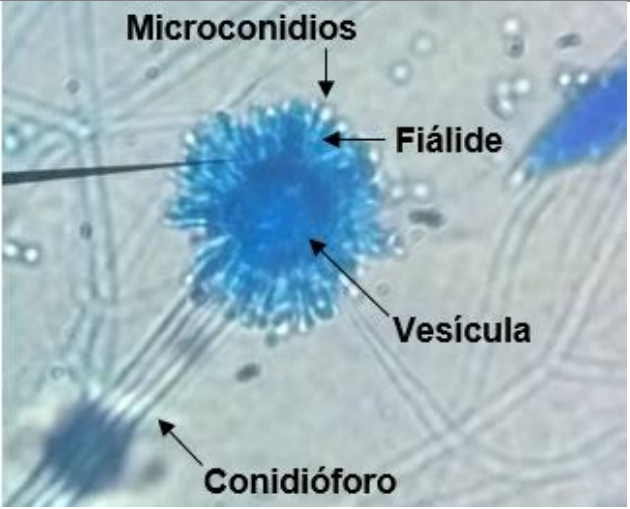


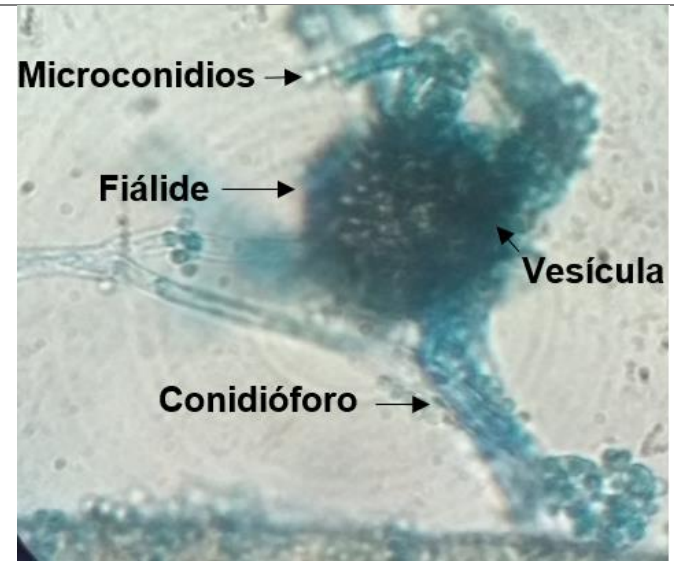
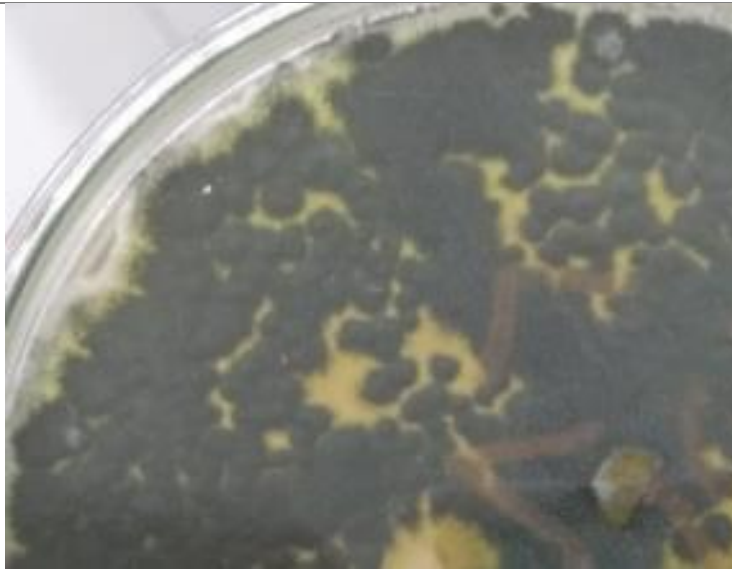
Figura 5. Clave taxonómica del género Aspergillus sp.

Fuente: tomado de (Bonifaz, 2012). Micología médica básica.

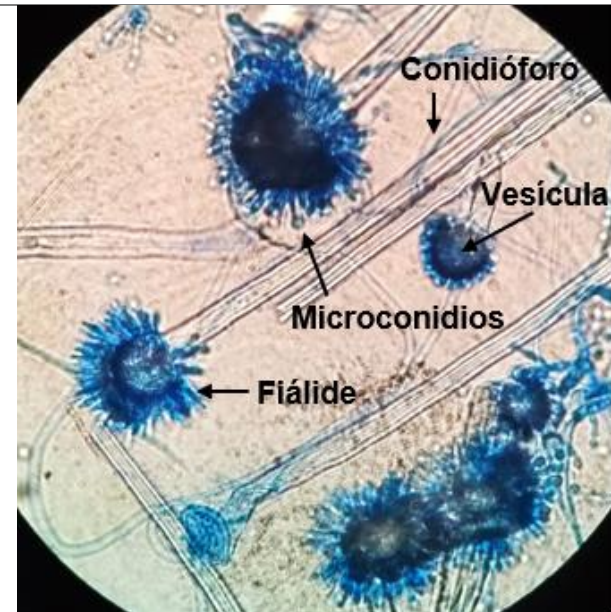
Tabla 7
Caracterización macroscópica y microscópica del género Aspergillus sp.

Nombre Asignado	Imagen Macroscópica	Imagen Microscópica
BsBH		 <p>Microconidios</p> <p>Fiálide</p> <p>Vesícula</p> <p>Conidióforo</p>
LC		 <p>Microconidios</p> <p>Fiálide</p> <p>Vesícula</p> <p>Conidióforo</p>

LV



LsVb



Fuente: autora del proyecto

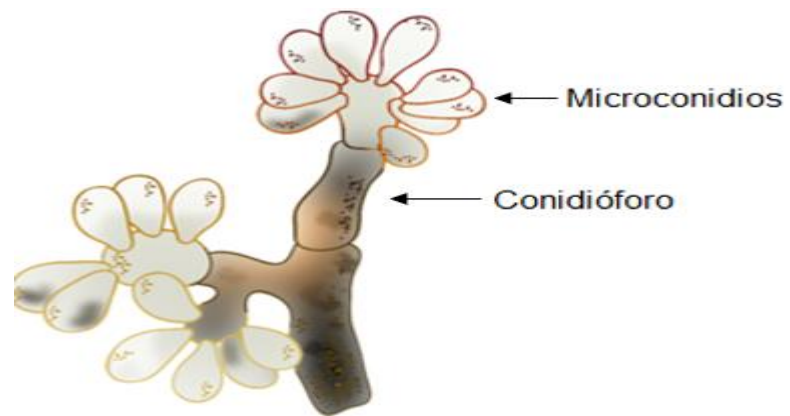



Figura 6. Clave taxonómica del género *Botrytis* sp.

Fuente: adaptado de (Lufke, 2013)

Tabla 8

Caracterización macroscópica y microscópica del género *Botrytis* sp.

Nombre Asignado	Imagen Macroscópica	Imagen Microscópica
LM		

Fuente: autora del proyecto.

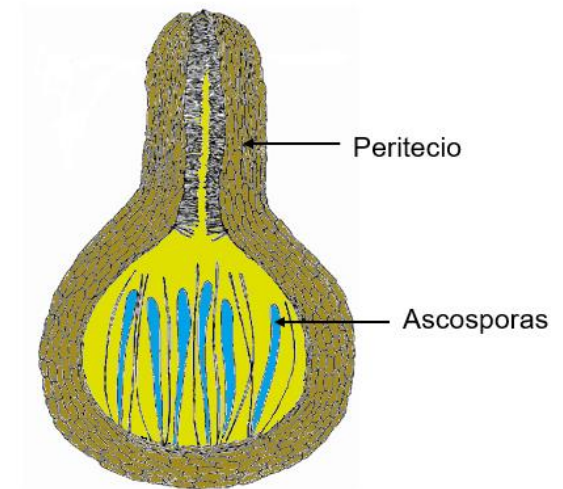
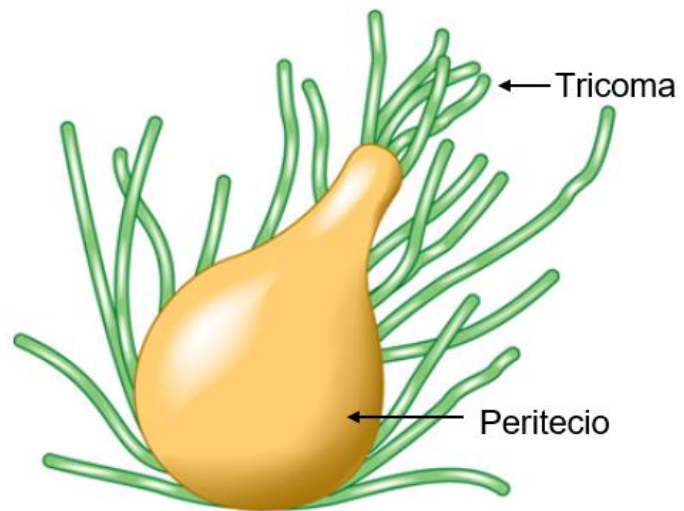

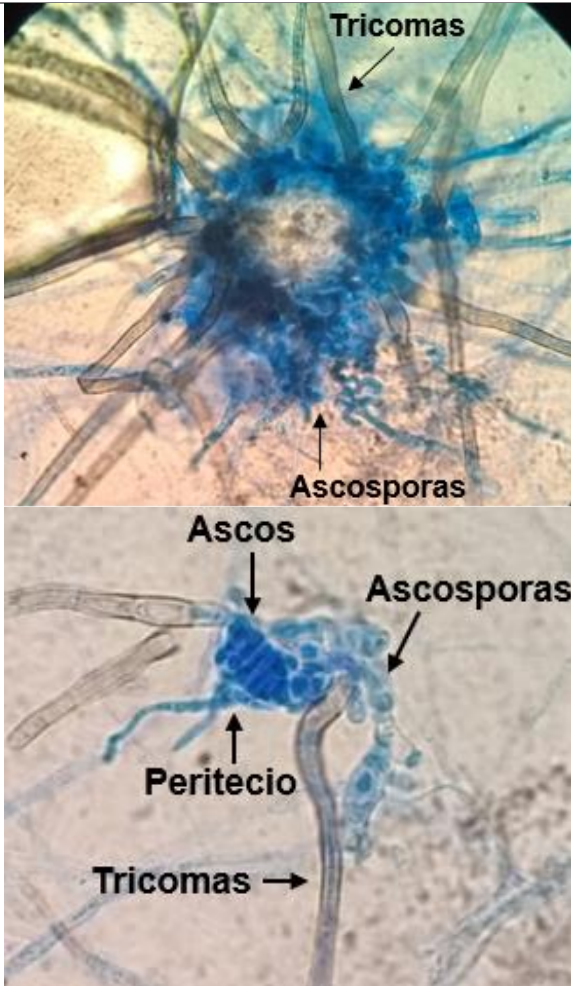


Figura 7. Clave taxonómica del género Chaetomium sp.

Fuente: adaptado de (Arenas, 2014). Micología médica ilustrada.

Tabla 9
Caracterización macroscópica y microscópica del género Chaetomium sp.

Nombre Asignado	Imagen Macroscópica	Imagen Microscópica
LsP		

Fuente: autora del proyecto.

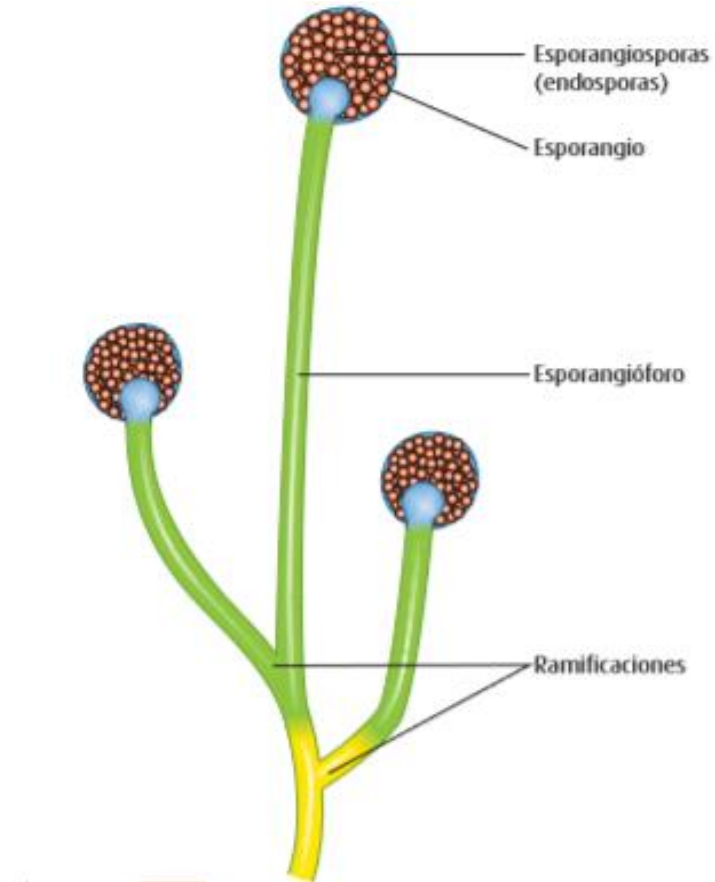

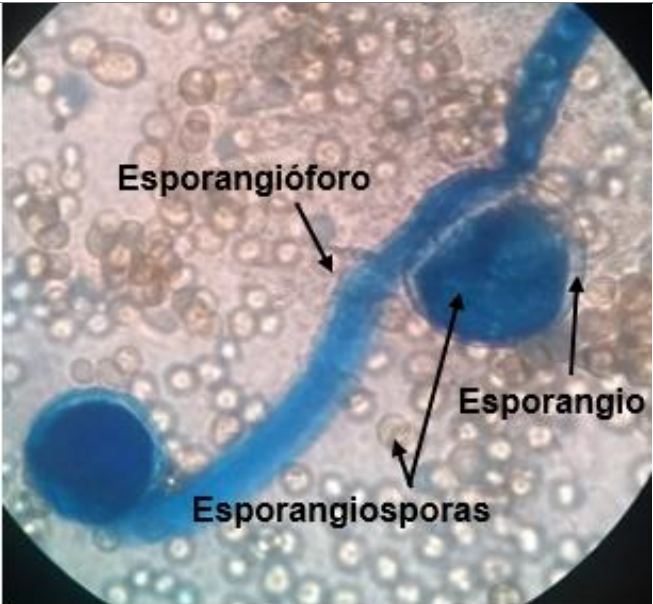


Figura 8. Clave taxonómica del género Mucor sp.

Fuente: tomado de (Bonifaz, 2012). Micología médica básica

Tabla 10

Caracterización macroscópica y microscópica del género Mucor sp.

Nombre Asignado	Imagen Macroscópica	Imagen Microscópica
LsC		

Fuente: autora del proyecto.

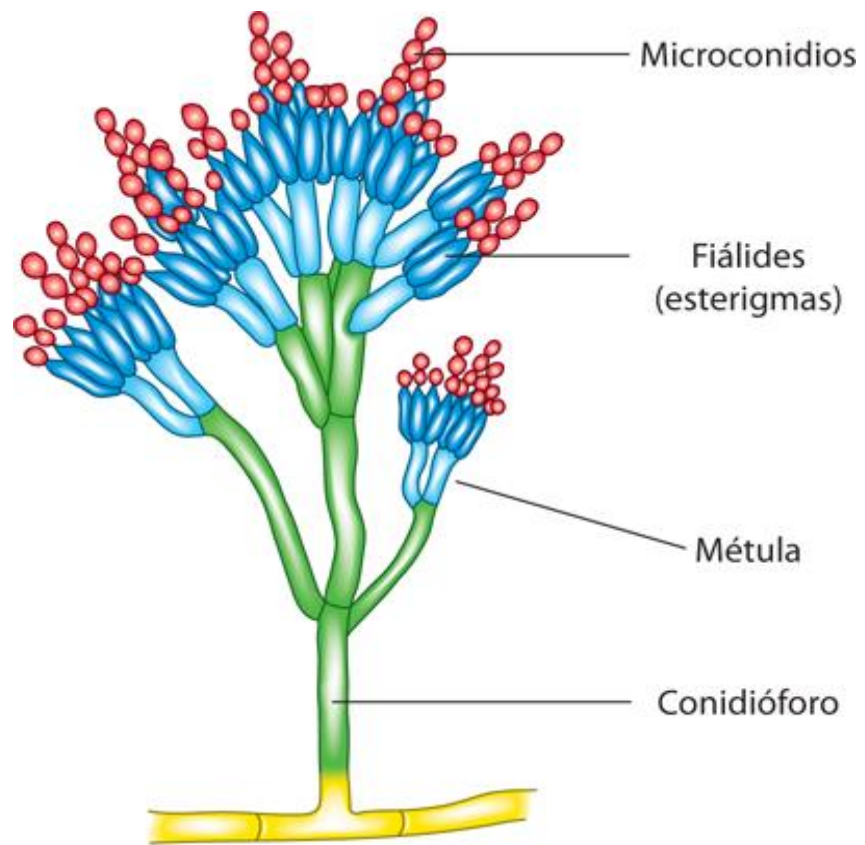


Figura 9. *Clave taxonómica del género Penicillium* sp.

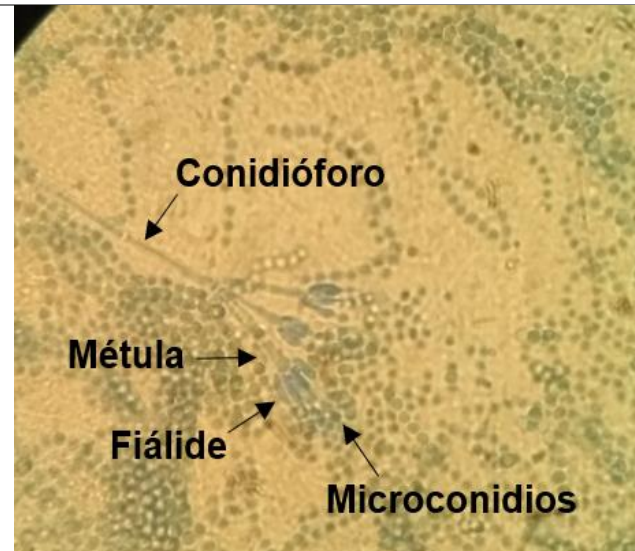
Fuente: tomado de (Bonifaz, 2012)

Tabla 11

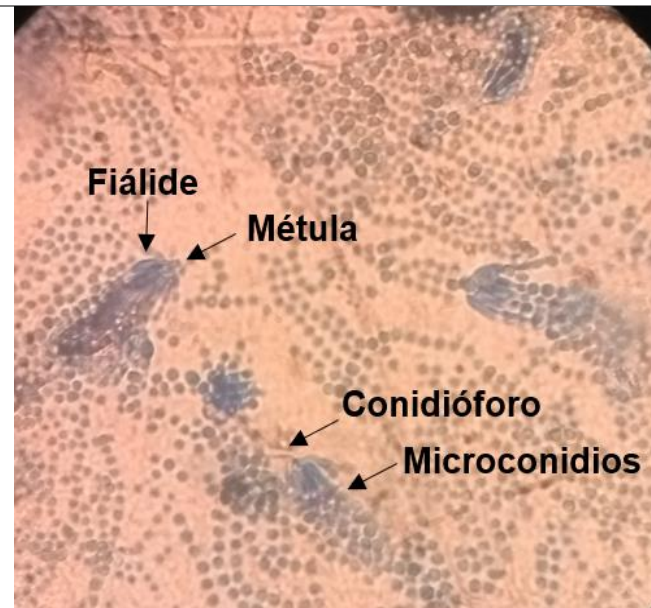
Caracterización macroscópica y microscópica del género Penicillium sp.

Nombre Asignado	Imagen Macroscópica	Imagen Microscópica
LsV		

LsVesp



LsVr



Fuente: autora del proyecto.

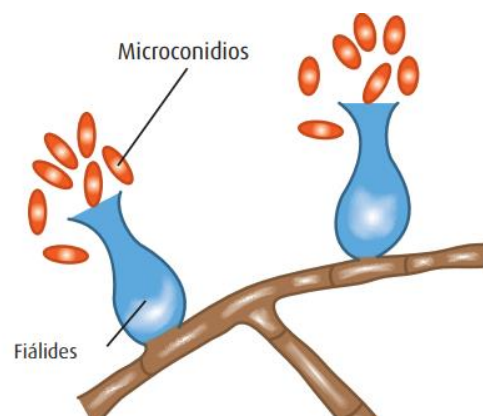


Figura 10. Clave taxonómica del género *Phialophora* sp.

Tomado de (Bonifaz, 2012)

Tabla 12

Caracterización macroscópica y microscópica del género *Phialophora* sp.

Nombre Asignado	Imagen Macroscópica	Imagen Microscópica
LsCo		

Fuente: autora del proyecto.

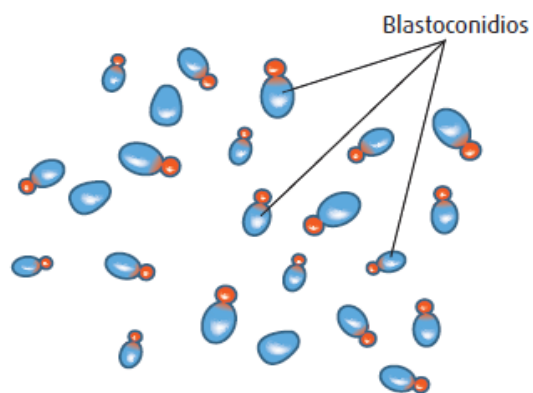


Figura 11. Clave taxonómica del género *Rhodotorula* sp.

Tomado de (Bonifaz, 2012)

Tabla 13

Caracterización macroscópica y microscópica del género *Rhodotorula* sp.

Nombre Asignado	Imagen Macroscópica	Imagen Microscópica
LsL		

Nota: Las microscopias fueron tomadas con un microscopio binocular de filtro azul, Axiostar Plus, Zeiss, con un lente de 100x y 40x según el tamaño propio de las estructuras visualizadas

Fuente: autora del proyecto.

De acuerdo con la clasificación mostrada en las tablas 6 a 13, la identificación de los aislamientos realizados según el género al que pertenece se muestra en la tabla 14.

Tabla 14

Asignación de géneros a los aislamientos realizados

Nombre Asignado	Género al que pertenece
BA	<i>Acremonium</i> sp.
LCo	
LVA	
LVP	
LsN	
LsVA	
LsVd	
BsBH	<i>Aspergillus</i> sp.
LC	
LV	
LsVb	
LM	<i>Botrytis</i> sp.
LsP	<i>Chaetomium</i> sp.
LsC	<i>Mucor</i> sp.
LsV	<i>Penicillium</i> sp.
LsVesp	
LsVr	
LsCo	<i>Phialophora</i> sp.
LsL	<i>Rhodotorula</i> sp.

Nota: Los prefijos en cada uno de los nombres asignados, corresponden a las siguientes matrices: B: bagazo contaminado, BH: bagazo hidrolizado, Bs: bagazo solo, L: *Luffa* contaminada y Ls: *Luffa* sola.

Fuente: autora del proyecto.

Las características físicas y estructurales de las muestras identificadas en los tres medios de cultivo y, con procedencia en las diferentes matrices en las condiciones definidas anteriormente se describirán a continuación, junto con el ambiente en el que comúnmente se desarrollan; según lo expuesto por Cepero, Restrepo, Franco,

Cardenas, & Vargas (2012). Al igual, que los estudios que se han realizado con estos géneros en matrices de tipo hidrocarbonadas, según Timmis (2010):

Acremonium sp.

Este género, perteneciente a la división Ascomycota; de colores que van desde el blanco, amarillo, naranja y verde, con textura algodonosa o aterciopelada y crecimiento lento a moderado. Su estructura se caracteriza por tener micelio fino, hialino y septado y sus células productoras de conidios, con apariencia de fiálide en forma de punzón. Se encuentra comúnmente en el suelo o en diversos cultivos y desechos de estos. Algunas especies de este género son generadoras de antibióticos, patógenas tanto del ser humano como de los animales y micoparásitas. Este género, ha sido reportado como posible degradador de diésel.

Aspergillus sp.

Pertenecientes a la división Ascomycota. Poseen una estructura con hifas septadas, unidas a una célula pie, en la que se origina un conidióforo no ramificado unido a una vesícula en la que se forman unas fiálides y en las que se encuentran los conidios unicelulares. Este género, es usado para diversas aplicaciones principalmente en el campo de la medicina y la cocina. Algunas son patógenas para los seres humanos y los animales, y pueden causar daño en granos y legumbres luego de su cosecha. Son productoras de micotoxinas. Este, es uno de los géneros que mayores reportes tiene referente a la degradación de sustancias hidrocarbonadas, debido a su alta efectividad y a su gran diversidad de especies que actúan en diversas matrices. Unos de los géneros reportados con mayor frecuencia son *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus* (Kumar, 2016)

Botrytis sp.

Perteneciente a la división Ascomycota. De color gris a marrón oscuro. De micelio septado y ancho. Los conidios, de forma globosa, cuadrada o elipsoidal, se forman sobre dentículos cortos en un arreglo botrioso, varias de sus especies son necrótrofos de plantas y se pueden encontrar en el suelo. Este género ha sido reportado en varias ocasiones con la capacidad de degradar petróleo crudo.

Chaetomium sp.

Pertenece a la división Ascomycota. En su estructura, se encuentran las ascosporas aseptadas, pigmentadas y con paredes lisas; los ascocarpos están sujetos al sustrato a través de hifas rizoidales y tienen peridio pseudoparenquimatoso. Las especies pertenecientes a este género son saprótrofas, celulíticas u oportunistas en el ser humano. Se encuentra en el suelo y en sustratos ricos en celulosa. Este género ha sido reportado como posible degradador de antraceno.

Penicillium sp.

Pertenecientes a la división Ascomycota. En su estructura, presentan conidióforo penicilado. Son hongos que se encuentran presentes en el suelo, el aire y la vegetación en descomposición. Este género, ha sido reportado en la degradación de pireno y crudo.

Phialophora sp.

Perteneciente a la división Ascomycota. Son de color marrón, gris o negro y textura aterciopelada. De crecimiento lento. De micelio septado, sus fiálides tienen forma de botella o cilindro y sus conidios son redondos, ovoides, cilíndricos o curvados, forman

cabezas mucilaginosas. Proviene del suelo, de detritos de agua subacuáticos y madera. Algunos son parásitos. Su actividad degradadora ha sido registrada en pireno.

Mucor sp.

Perteneciente a la división Zygomycota, de crecimiento rápido, presentan hifas hialinas a marrón, esporangios globosos y esporangiosporas café de pared lisa a ornamentada. Se encuentran comúnmente en el suelo, pueden ser dimorfas. Ha sido reportado en la degradación de pireno.

Rhodotorula sp.

Pertenecientes a la división Basidiomycota. De color salmón o naranja y textura cremosa. Sus células son de forma esférica, ovoidal o elongada y su crecimiento es rápido. Esta levadura, ha sido detectada en la degradación de crudo.

De los ocho géneros clasificados, solo tres de ellos crecieron en matrices contaminadas con petróleo, *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., y *Botrytis* sp.; aun así, todas han sido estudiadas sobre su adaptación, crecimiento y/o degradación de crudo. Sin embargo, su actividad degradadora difiere bastante entre estos géneros; por lo que, los más conocidos y estudiados son *Aspergillus* sp., y *Penicillium* sp., al presentar una muy buena actividad degradadora en petróleo crudo, entre los ocho géneros aislados.

De los géneros identificados, seis pertenecen a la división Ascomycota, uno a la división Zygomycota y uno a la división Basidiomycota, siendo, por lo tanto; la división Ascomycota, la de mayor presencia en las muestras clasificadas.

Con el fin de distinguir la procedencia de los distintos géneros en las matrices sembradas, para conocer el posible sustrato que consumieron para desarrollarse, junto con el medio que favoreció su crecimiento, se realizó la tabla 15.

Tabla 15

Procedencia de los aislamientos realizados en las cinco matrices y en los tres medios dispuestos

Medio de cultivo	Bagazo solo (Bs)	Bagazo hidrolizado (BH)	Bagazo contaminado (B)	<i>Luffa</i> sola (Ls)	<i>Luffa</i> contaminada (L)
Czapeck		<i>Botrytis</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.		<i>Acremonium</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Botrytis</i> sp.
PDA	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.		<i>Acremonium</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Chaetomium</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Phialophora</i> sp. <i>Rhodothorula</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.
AEM				<i>Acremonium</i> sp. <i>Mucor</i> sp.	

Fuente: autora del proyecto.

El resultado mostrado en la Tabla 15, permite comparar el crecimiento de los aislamientos, de acuerdo con el sustrato del que provienen y al medio en el que crecieron. Dentro de estas muestras, se puede observar que la mayor diversidad de géneros presentes, proviene de las muestras de *Luffa*. Para el caso de la muestra con *Luffa* sola, crecieron once aislamientos diferentes, mientras que para la muestra de *Luffa* contaminada con crudo, crecieron seis aislamientos. Para el caso del bagazo contaminado con crudo, creció un aislamiento, en el bagazo hidrolizado, crecieron dos aislamientos, uno de ellos (BsBH), también creció en bagazo solo y se identificó como el

mismo aislamiento; sin embargo, se dejó en la tabla para indicar que si había por lo menos un aislamiento que creció en bagazo solo; de igual modo se realizó con el aislamiento *Botrytis* sp., el cual creció en *Luffa* contaminada y bagazo hidrolizado. De las muestras sembradas, se encontró que el género *Acremonium* sp., es el que más representantes tiene con siete aislamientos, el cual creció en cada medio, en las dos matrices que contenían *Luffa* y en la muestra de bagazo solo cuando estaba contaminado; el segundo género con mayor crecimiento fue *Aspergillus* sp., con cuatro aislamientos, los cuales crecieron en Czapeck y en PDA en cada una de las matrices a excepción de la de bagazo contaminado; por último, el tercer género con mayor número de aislamientos, fue *Penicillium* sp., con tres, los cuales solo crecieron en PDA y en la matriz que contenía *Luffa* sola.

De los ocho géneros clasificados, solo tres de ellos crecieron en matrices contaminadas con petróleo, *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., y *Botrytis* sp.; aun así, todas han sido reportadas en estudios donde asocian la adaptación, crecimiento y/o degradación de estos géneros en suelos contaminados con crudo. Sin embargo, su actividad degradadora difiere bastante entre estos géneros; por lo que, los más conocidos y estudiados son *Aspergillus* sp., y *Penicillium* sp., al presentar una muy buena actividad degradadora en petróleo crudo entre estos ocho géneros.

Dentro de las réplicas que se realizaron de la siembra de las primeras matrices en los tres medios, varios aislamientos con las mismas características microscópicas, y similares características macroscópicas, pertenecientes al género *Acremonium* sp., *Botrytis* sp., y *Penicillium* sp., crecieron en dos de los tres medios expuestos o en todos los medios empleados; sin embargo, solo se conservó, empleó y registró aquellos

aislamientos con idénticas características en el medio de cultivo en el que mejor desarrollo presentaron. Uno de los objetivos de los medios de cultivo, es la propagación del aislamiento deseado; por lo que, la composición de estos medios cambia según los requerimientos de las muestras en las diferentes clasificaciones dadas como: su desarrollo reproductivo, el ambiente en el cual se desarrollen, la enzima que se desea producir, el género al que pertenece, entre otras (Bonifaz, 2012). Para el caso del PDA, compuesto de pulpa de papa, dextrosa, agar-agar y agua destilada es un medio de cultivo no selectivo en el que pueden crecer diversos hongos como aquellos clasificados como parásitos de plantas, saprófitos y especialmente, aquellos clasificados como filamentosos y las levaduras, debido a que este medio contiene los nutrientes esenciales para este tipo de hongos (Cañedo, 2004). Este medio, contiene gran cantidad de azúcar debido a la combinación de la papa con la glucosa proporcionando una excelente fuente de energía y por lo tanto un buen crecimiento y desarrollo de los hongos (Gil, 2019). Para el caso del Czapeck Dox agar, un medio selectivo, compuesto de sacarosa, nitrato de sodio, fosfato dipotásico, sulfato de magnesio, cloruro de potasio, sulfato ferroso, agar-agar y agua destilada; sus constituyentes permiten la proliferación de hongos saprófitos. En este medio, el nitrógeno es de tipo inorgánico, por lo que los organismos que crecen deben ser capaces de utilizar este tipo de compuestos para obtener el nitrógeno necesario para su crecimiento (Gil, 2019). Debido a esto, se usa generalmente para lograr con mayor efectividad el aislamiento de especies de los géneros *Aspergillus* sp., y *Penicillium* sp. (Bonifaz, 2012). Para el caso de AEM, compuesto de extracto de malta, peptona de soja, agar-agar y agua destilada; se emplea para la fructificación de aislamientos. En este medio, se aíslan y crecen de forma óptima, los hongos como las levaduras y mohos debido a la alta cantidad de energía proporcionada por los sacáridos

presentes por los constituyentes de este medio, como la maltosa y al pH ácido de este (4,7) (Condalab, 2019). Los aislamientos realizados en este proyecto, crecieron con la siguiente distribución, trece en PDA, cuatro en Czapeck y finalmente dos en AEM.

Lo anterior confirma la razón por la que la mayor cantidad de aislamientos se encontraron en PDA; por otra parte, aunque Czapeck es usado para aislar con mayor facilidad especies del género como *Aspergillus* sp., y *Penicillium* sp., no todos los aislamientos de estos hongos crecieron en este medio, algunos de estos aislamientos no crecieron en PDA pero si crecieron Czapeck como LC y LV (Ambos pertenecientes al género *Aspergillus* sp.); pero el caso contrario también ocurrió, pues aislamientos como BsBH (perteneciente al género *Aspergillus* sp.) y LsV, LsVesp y LsVr (pertenecientes al género *Penicillium* sp.) crecieron en PDA pero no en Czapeck; esto, pudo deberse a la preferencia de nutrientes que requiere cada aislamiento o tal vez a que aquellas especies que no crecieron en Czapeck, no tienen la capacidad de utilizar el nitrógeno en estado inorgánico. Para el caso del AEM, el aislamiento perteneciente a *Acremonium* sp., creció en los tres medios empleados; debido probablemente, a que la mayoría de sus especies son saprófitas y pueden, por los componentes presentes en estos medios crecer adecuadamente; sin embargo, el aislamiento LsN, solo se desarrolló en este medio; esto podría deberse a la necesidad de obtención de grandes cantidades de azúcares para crecer adecuadamente o al aprovechamiento de la peptona de soja, componente de este medio de cultivo, al usar el carbono y las vitaminas presentes en este compuesto. Al igual que el aislamiento perteneciente al género *Mucor* sp.; el cual, de igual modo, creció solo en este medio. Estos dos géneros, son clasificados como mohos, y por lo tanto se consideran aptos para crecer en AEM. Los tres medios generales, se realizaron con el

fin de aumentar las posibilidades de crecimiento de los hongos encontrados en las muestras originales.

6.2 Evaluación de la actividad degradadora de crudo por parte de los hongos aislados de las fibras vegetales con crudo adsorbido

Para el segundo objetivo, una vez realizada la clasificación de los aislamientos, se llevó a cabo un estudio preliminar de degradación en crudo para conocer dentro de las cepas aisladas, cuáles eran capaces de degradar esta sustancia como una aproximación al posible crecimiento mostrado en los recipientes contaminados de los cuales provenían las muestras. Los resultados que mejor desempeño mostraron, fueron probados en curvas de crecimiento para conocer el comportamiento y una aproximación a la efectividad degradadora de los aislamientos probados en crudo. La degradación de crudo se midió de forma indirecta, pesando la masa seca ganada por el hongo al tener en cuenta que, en los ensayos la única fuente de carbono disponible era el crudo.

Por lo anterior, se seleccionaron las seis cepas que con mayor facilidad se aislaban dentro de las diecinueve identificadas, con el fin de estimar su potencial de degradación. Los resultados se muestran en la figura 12.

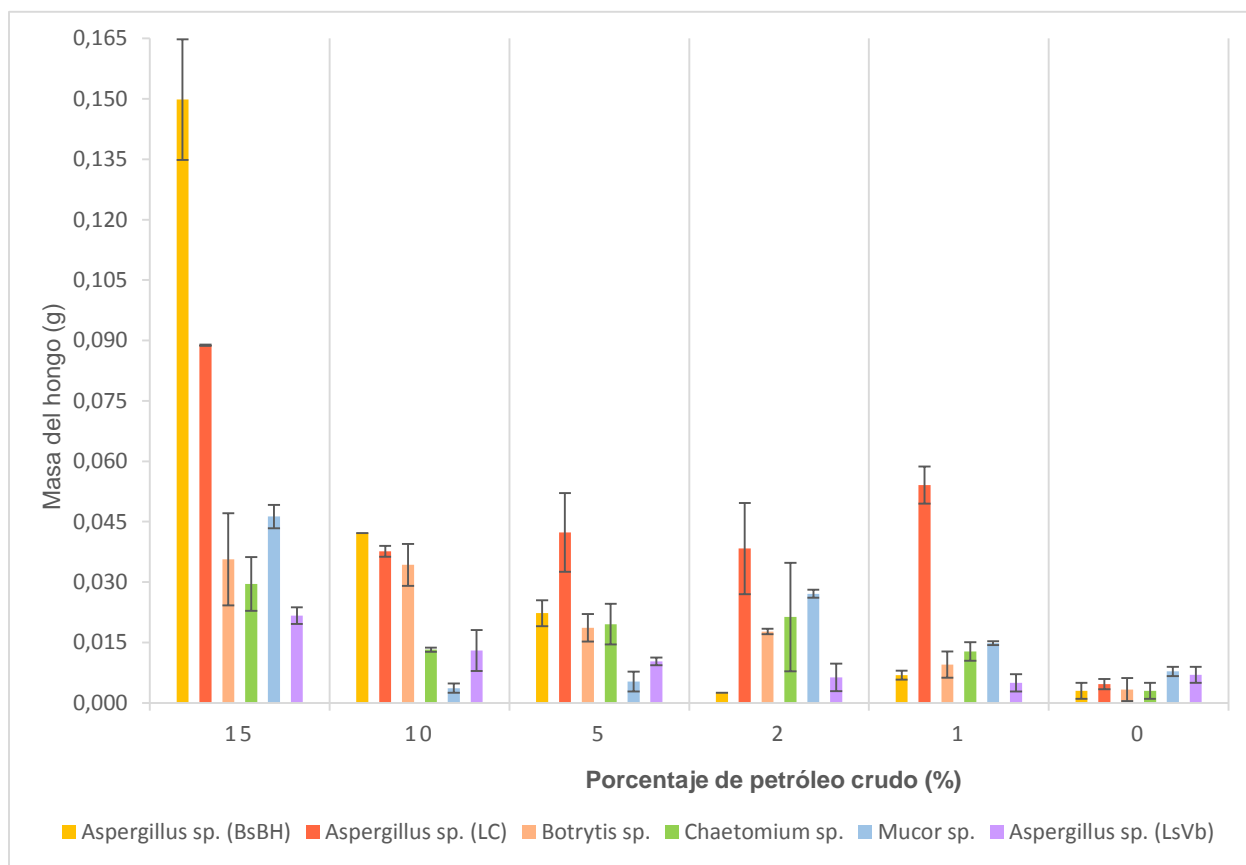


Figura 12. Gráfico de barras comparativo entre los resultados de la prueba preliminar de degradación de crudo

Fuente: Autora del proyecto

Para la prueba de degradación de crudo con un porcentaje del 15% y 10% los mejores resultados fueron *Aspergillus* sp., (BsBH), *Aspergillus* sp., (LC), en orden consecutivo.

Para el caso de la prueba de degradación al 5%, 2% y 1% de crudo, la muestra que mayor crecimiento presentó fue *Aspergillus* sp., (LC).

El comportamiento presentado por *Aspergillus* sp., (BsBH) muestra la capacidad de asimilación que tiene este género cuando está en contacto con altas concentraciones de crudo como sustrato, pues, como se observó en la figura 12, el crecimiento que tuvo este aislamiento, fue el más alto dentro de las muestras expuestas en las pruebas

preliminares cuando se encontraba en contacto con los mayores porcentajes evaluados (15% y 10%) mientras que cuando se encontraba expuesto a porcentajes menores (5%, 2% y 1%), el crecimiento de esta especie disminuía notablemente, alejándose de las muestras que presentaban los mejores resultados; este suceso, puede deberse al hecho de que esta especie necesita de gran cantidad de carbono para su crecimiento empleando; por lo tanto, altos porcentajes de crudo para ello; junto al hecho de que son acumuladores natos tolerando concentraciones altas (Kumar, 2016). Lo anterior, puede mostrar la posibilidad de ser empleada en situaciones de derrame de crudo, al emplear grandes cantidades de esta sustancia para su crecimiento al consumir componentes propios del petróleo y romper algunas de sus cadenas carbonadas, aportando a la descontaminación del medio y en la generación de residuos menos tóxicos.

Aspergillus sp., (LC) por su parte, mostró ser el mejor resultado en todas las pruebas, a excepción de los resultados con 15% y 10%, solo superado por *Aspergillus* sp., (BsBH) lo que demuestra una muy buena capacidad de degradación de crudo frente a las muestras analizadas, cuando se encuentra presente tanto en altas como en bajas concentraciones.

Para el caso de *Aspergillus* sp., (LsVb), en todas las pruebas con los diferentes porcentajes de crudo probados, se encontró en último o penúltimo lugar dentro de los aislamientos probados, mostrando una menor recepción al uso del crudo como sustrato frente a las demás cepas probadas y sobre todo, frente a los dos aislamientos pertenecientes a su mismo género.

Referente a la marcada diferencia entre el comportamiento presentado por los tres aislamientos del género *Aspergillus* sp., puede deberse al hecho de la gran diversidad

en la variación de los sistemas enzimáticos producidos por cada una de las especies de este género; utilizando diversos sustratos con el fin de realizar procesos de síntesis celular (Ezekoye, Chikere, & Okpokwasili, 2018).

Las tres muestras pertenecientes al género *Aspergillus* sp., son macro y microscópicamente distintas, por lo que fueron identificadas como tres aislamientos diferentes. Kumar (2016) expone varias de las características que se han encontrado son vitales para que las especies de este género sean capaces de degradar compuestos hidrocarbonados, estas características son: este género es hiperacumulador de sustancias, crecimiento filamentosos, haciendo efectivo el contacto entre el hongo y la sustancia contaminante, baja especificidad al sustrato, capacidad de sobrevivir en condiciones climáticas extremas y con baja disponibilidad de nutrientes, disminución de la toxicidad de los contaminantes. Este género de hongos, es capaz de segregar diversas enzimas que ayudan en el proceso de la biorremediación de diferentes componentes; sin embargo, debido a la gran cantidad de especies que tiene este género, la diversidad de enzimas en cada especie, no es la misma, por lo que se encuentran marcadas diferencias entre los compuestos o sustancias que una especie puede degradar de forma más efectiva a comparación de otra especie. Una investigación realizada por Ezekoye Chikere & Okpokwasili (2018) en un sitio contaminado con petróleo, demostró la capacidad de adaptación y la eficiencia de veintiún especies fúngicas, donde seis de ellas, eran diferentes especies de *Aspergillus* sp., encontradas antes, durante y después del estudio de remediación del lugar, hallando especies que sobreviven naturalmente en este ambiente, aprovechan el crudo como sustrato. Este género, es uno de los que se conoce tiene una buena tolerancia a los compuestos hidrocarbonados; por lo que su

actividad en crudo es conocida y respalda la evidencia presentada en las pruebas preliminares realizadas.

Referente a las demás muestras probadas en las pruebas preliminares, con los hongos del género *Mucor* sp., *Chaetomium* sp., y *Botrytis* sp., se realizó una revisión bibliográfica con el fin de conocer si se habían realizado estudios acerca de su acción degradadora o su capacidad de adaptación en petróleo crudo.

Para el caso de *Mucor* sp., se encontró que los compuestos que tiende a degradar cuando esta expuesto al crudo son los alcanos y los naftalenos (Riser-Roberts, 1998).

Para el caso de *Chaetomium* sp., la revisión bibliográfica acerca de la acción degradadora de este género en petróleo crudo, fue baja; un estudio realizado por Onyekweli (2003) mostró un caso en el que la degradación de madera cuando se encontraba en contacto con petróleo no se llevó a cabo debido a la baja o nula capacidad de degradación que tenía una muestra de hongos conformado por *Pleurotus* sp., *Trametes* sp., *Gloeophyllum* sp., y *Chaetomium* sp., Los registros mostraron que la degradación de la madera pudo ser viable luego de que organismos capaces de degradar compuestos del petróleo crudo como la *Pseudomonas* sp., actuaron en este tipo de hidrocarburo; produciendo posiblemente tras la degradación, sustancias susceptibles de ser usadas por la muestra fúngica en cuestión para su aprovechamiento y aumento de la población existente. Una vez degradada la suficiente cantidad de petróleo, y consumidos los productos de la degradación del crudo, fue posible la acción significativa de la descomposición de madera. En este estudio, se mostró como hipótesis, la posibilidad de que ciertos organismos fúngicos con una importante capacidad de degradación de madera, no siempre son susceptibles a la degradación de compuesto de

tipo hidrocarbonado. Las investigaciones realizadas que sugieren un buen potencial de degradación por parte del género *Chaetomium* sp., se encuentran orientadas a los siguientes compuestos: tinte industrial índigo, formado principalmente del indoxilo (compuesto orgánico de nitrógeno), reportado por Manai y otros (2016) y la descomposición y reducción de lignocelulosa y xilano, estudio reportado por Jung, Jun & Heon (2016).

Los estudios realizados referente al género *Botrytis* sp., se centran principalmente en la especie *Botrytis cinérea*, debido a su actividad patogénica en varias especies vivas; los casos registrados frente a la actividad degradadora que tiene este género principalmente en la especie *B. cinérea*, se conoce en compuestos de CuO (monóxido de cobre) y en nanopartículas de cobre, caso reportado por Kovacec y otros (2017) y en sesquiterpenoides como capsidiol, carofileno y ginsenol, en monoterpenoides como linalool, citronelol y alcohol bencílico y flavonas, caso reportado por Aleu & González (2001).

En cada uno de los datos obtenidos, los mejores resultados se obtuvieron cuando se encontraban expuestos a un porcentaje de crudo del 15%; para asegurar la limpieza total del crudo en las muestras fúngicas, se observó que visualmente no quedarán residuos en el papel filtro del crudo y que el sobrenadante filtrado saliera transparente. Estos resultados, parecen reflejar la importancia en la disponibilidad de nutrientes necesarios para los hongos, al ser uno de los principales factores para el debido desarrollo de los hongos, razón por la cual las muestras fúngicas presentan mejor comportamiento cuando se encuentran expuestas a altos porcentajes de sustrato, aunque sean consideradas como sustancias tóxicas y/o contaminantes (Yemashova, y otros, 2007).

De la tabla 15, se puede señalar que, dentro de los seis aislamientos probados, BsBH, perteneciente al género *Aspergillus* sp., solo creció en bagazo solo o en bagazo hidrolizado pero no se observó crecimiento en bagazo contaminado con crudo; sin embargo, si demostró buen crecimiento en las pruebas preliminares cuando estaban expuestas solo a altos porcentajes de crudo; por lo que, el hecho de no haber crecido en bagazo contaminado pudo deberse a la baja cantidad de crudo encontrado en el recipiente del que provino. Para el caso de LC, perteneciente también al género *Aspergillus* sp., solo creció en la muestra de *Luffa* cuando estaba expuesta a crudo, mientras que cuando estaba expuesta a *Luffa* sola, no creció; esto puede sugerir que este aislamiento provenía del crudo. Por el contrario, *Mucor* sp., y *Chaetomium* sp., se aislaron de la *Luffa* sola pero no crecieron en *Luffa* con crudo adsorbido, en concordancia con su fuente de aislamiento, estas dos morfoespecies no mostraron los mejores resultados en las pruebas preliminares; Finalmente, *Botrytis* sp., creció tanto en *Luffa* sola, como en *Luffa* contaminada; sin embargo, tuvo un mejor desarrollo en *Luffa* contaminada. Este hecho, permite pensar que el crecimiento de los aislamientos *Aspergillus* sp. (LC) y *Botrytis* sp., se debió, a que pudieron consumir parte del petróleo que se encontraba en el medio. Caso contrario pudo haber ocurrido en el caso de *Mucor* sp., y *Chaetomium* sp., los cuales, aunque crecieron en las pruebas preliminares, no mostraron un gran desarrollo cuando estaban expuestas al crudo, por lo que puede decirse que su capacidad de crecer en un medio contaminado con petróleo no es la mejor al encontrar en el medio una sustancia difícil para descomponer y alimentarse de ella.

Características del petróleo empleado:

El petróleo empleado para las pruebas realizadas en este proyecto, tenía propiedades completamente desconocidas, a excepción de las percibidas a primera vista como color o viscosidad. Por lo que, con ayuda del picnómetro se realizaron los cálculos de densidad para conocer una propiedad importante y así, dar una aproximación de qué tipo de petróleo era el empleado, por lo que se llevaron a cabo los siguientes cálculos:

1. Densidad del crudo:

$$\rho_{crudo} = \frac{(m_p + crudo) - m_p}{V_p}$$

Donde:

ρ_{crudo} = densidad del crudo

$m_p + crudo$ = masa del picnómetro + masa del crudo

m_p = masa de picnómetro

V_p = volumen del picnómetro

$$\rho_{crudo} = \frac{20,165 \text{ g} - 11,5 \text{ g}}{10 \text{ ml}} = 0,8665 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$$

Debido a que la densidad del petróleo crudo se clasifica comúnmente por grados API, según el American Petroleum Institute (EITI, 2016), es necesario llevar la densidad encontrada hasta grados API para saber en cuál de las cuatro categorías establecidas por este instituto se encuentra. Esta clasificación es liviana ($API > 31,1^\circ$), media ($31,1^\circ < API < 22,3^\circ$), pesada ($22,3^\circ < API < 10^\circ$), o extra pesada ($API < 10^\circ$). Para hallar los $^\circ API$, es necesario saber primero la gravedad específica de la sustancia.

2. Gravedad específica

$$GE (\rho_r) = \frac{\rho_{crudo}}{\rho_{H_2O}}$$

Donde:

GE = gravedad específica

ρ_{H_2O} = densidad del agua

$$GE = \frac{0,8665 \text{ g/ml}}{1 \text{ g/ml}} = 0,8665$$

Una vez hallada la GE de la sustancia, se procede a conocer los °API.

3. Grados API

$$^{\circ} API = \frac{141,5}{GE} - 131,5$$

Donde:

°API = grados API

$$^{\circ} API = \frac{141,5}{0,8665} - 131,5 = 31,80$$

Debido a que el valor de los °API del crudo empleado corresponde a 31,8°, se puede clasificar como liviano. De la Tabla 1 según la densidad a la que corresponde este petróleo, tiende a ser de color claro y de viscosidad fluida, características confirmadas en el laboratorio al trabajar con esta sustancia. Este tipo de crudo, tiene mayor contenido de elementos parafínicos, los cuales son principalmente cadenas lineales y ramificadas. Este tipo de compuestos, como se había comentado dentro del marco teórico, suelen ser descompuestos por los organismos mediante vía oxidativa.

6.2.1 Curvas de crecimiento

Como se observó en la figura 12, los mejores resultados son dos de las especies de *Aspergillus* sp., LC y BsBH, en las que, el mejor comportamiento en ambos aislamientos se presentó cuando estaban expuestas en las pruebas de 15% de crudo; por esto, estas dos muestras se escogieron para realizar las curvas de crecimiento con el fin de conocer el comportamiento presentado por estos dos aislamientos.

La primera curva realizada, perteneció al aislamiento nombrado LC. El comportamiento presentado por este aislamiento se muestra en la figura 13.

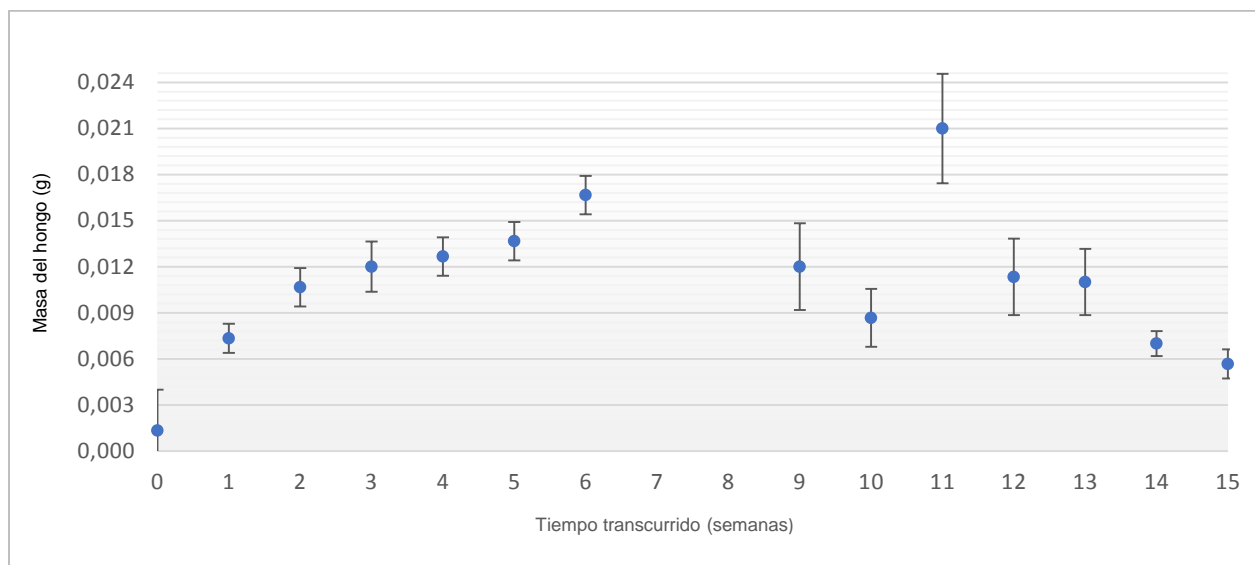


Figura 13. Curva de crecimiento del aislamiento LC

Fuente: Autora del proyecto.

La curva de crecimiento de este aislamiento se realizó durante un periodo de tiempo de quince semanas, en el cual, el aislamiento presentó poco crecimiento. Sin embargo, el análisis de varianza de un factor con nivel de significancia de 0,05 muestra que hay diferencias entre semanas ($F > F_{\text{crítico}}$) confirmando las diferencias comportamentales del aislamiento dentro de la curva de crecimiento en las diferentes fases características. Como se muestra en la figura 13, la curva parece iniciar con una fase logarítmica durante

las primeras dos semanas, en las que probablemente aprovechó algunos hidrocarburos de cadena corta disponibles en el crudo; luego, comienza una fase de latencia comprendida desde la segunda hasta la décima semana, esto pudo ocurrir debido a que la matriz fue difícil de descomponer, hubo poco del componente usado como fuente de carbono y energía o se encontraron sustancias tóxicas que detuvieron momentaneamente su crecimiento mientras fueron en cierto grado descompuestas.

Entre la décima y la décima primera semana parece haber una fase logarítmica en la que se alcanza el mayor crecimiento mostrado para este aislamiento bajo las condiciones del experimento. Luego, entre la semana décimo primera y décimo segunda se evidencia una disminución en el crecimiento del aislamiento, mostrando dificultad para estabilizarse. Entre la semana décimo segunda y décimo tercera, parece lograrse esa estabilización llegando a una fase estacionaria; y finalmente, en las siguientes dos semanas, entran a una fase de muerte. Las anteriores afirmaciones, se respaldan por los valores obtenidos para P en la prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales (con un nivel de significancia de 0,05) la cual se usó para comparar las masas medidas del hongo semanalmente, los resultados se muestran en la tabla 16. Lo anterior demuestra que el hongo parece crecer por pulsos debido a la diferente oferta de fuentes de carbono que puede tener una matriz tan compleja como el petróleo crudo, a estas fases de latencia seguidas por fases logarítmicas de crecimiento se les conoce como diauxias y son típicas en matrices complejas.

Referente a la semana séptima y octava, no fue posible tomar los datos semanales de la curva de crecimiento, debido al cierre de la universidad por la semana Santa.

Tabla 16

Comparación entre los valores obtenidos de masa del aislamiento LC para la curva de crecimiento mostrada en la figura 13. Valor P obtenido de la prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales con un nivel de significancia de 0,05

Comparación entre semanas	Valor P
0 vs 1	0,0146
1 vs 2	0,0394
2 vs 3	0,4107
3 vs 4	0,6702
4 vs 5	0,4676
5 vs 6	0,0739
6 vs 9	0,0996
9 vs 10	0,2378
10 vs 11	0,0123
11 vs 12	0,0347
12 vs 13	0,8933
13 vs 14	0,0705
14 vs 15	0,2051

Nota: Los valores menores a P se muestran en negrilla para resaltar las semanas en las que hubo un crecimiento estadísticamente significativo.

Además de la curva de crecimiento para el aislamiento LC, se construyó la del aislamiento BsBH, la cual se muestra en la figura 14.

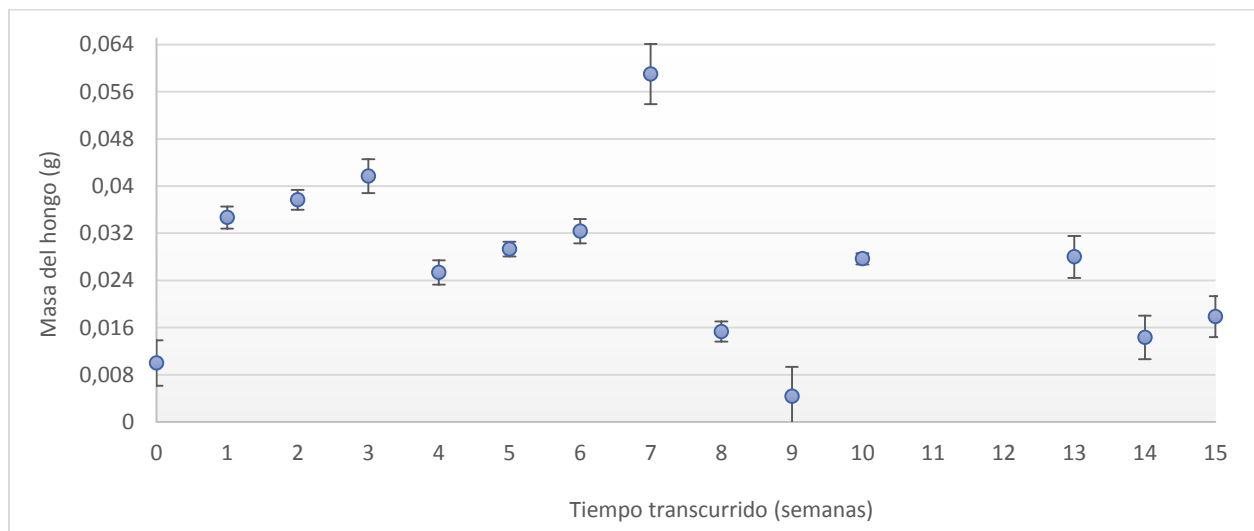


Figura 14. Curva de crecimiento del aislamiento BsBH

Fuente: Autora del proyecto

El comportamiento presentado por el aislamiento BsBH, se evaluó durante quince semanas, aunque el crecimiento fue un poco mayor que el del aislamiento LC, también se hizo un análisis de varianza de un factor con nivel de significancia de 0,05 con el fin de mostrar que hubo una diferencia entre las masas obtenidas del hongo en las semanas en las que se llevó a cabo el experimento ($F > F_{\text{crítico}}$).

En la figura 14 se observa que en la primera semana, se presentó un crecimiento en fase logarítmica, mostrando el posible aprovechamiento de hidrocarburos de cadena corta, de la primera a la tercera semana entró en una fase de latencia en la cual, se estaba adaptando al medio en el que se encontraba, de la tercera a la cuarta semana, ocurrió una fase de muerte en la que la población disminuyó notablemente, este comportamiento pudo deberse a la baja asimilación que presentó el aislamiento a la matriz contaminante con la que se encontraba. Sin embargo, de la semana cuarta a la sexta, ocurrió de nuevo una fase de latencia en la que, los organismos comenzaron sutilmente a aumentar su población, quizás porque empezaron a adaptarse a otra sustancia para consumir y aprovechar el sustrato existente o a la acción de disminución de los residuos tóxicos que estuvieron presentes mientras se encontraban en las dos fases de latencia, de la semana sexta a la séptima ocurrió una fase logarítmica, de la semana séptima a la octava hubo un decrecimiento importante en la masa ganada por el hongo, llevando a la menor masa registrada desde el inicio de la curva de crecimiento, de la semana octava a la novena, hubo una fase logarítmica que aumentó un poco la población existente, de la semana novena a la décima se presentó nuevamente un decrecimiento de la masa presente, el cual no varió hasta la semana décimo cuarta, en la que el hongo parece entrar en fase de muerte.

Los datos correspondientes a la semana décimo primera y décimo segunda, no se tomaron debido a inconvenientes presentados en el laboratorio de la universidad con los elementos necesarios para llevar a cabo la toma de resultado.

Al igual que en la figura 13, en esta curva de crecimiento se observan diauxias, en un crecimiento por pulsos que permite pensar, en el aprovechamiento realizado por la muestra de al menos tres sustancias principales que componen el crudo, al presentar tres fases logarítmicas, las cuales fueron empleadas en diferentes momentos según su disponibilidad para su empleo como fuente de carbono y con esto, la disminución del contaminante. Del mismo modo que en la curva mostrada en la figura 13, en esta curva las anteriores observaciones, como en el caso del aislamiento LC, fueron soportadas por los valores obtenidos para P en la prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales (con un nivel de significancia de 0,05) la cual se usó para comparar las masas medidas del hongo semanalmente, los resultados se muestran en la tabla 17.

Tabla 17

Comparación entre los valores obtenidos de masa del aislamiento BsBH para la curva de crecimiento mostrada en la figura 14. Valor P obtenido de la prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales con un nivel de significancia de 0,05

Comparación entre semanas	Valor P
0 vs 1	0,0001
1 vs 2	0,1700
2 vs 3	0,1649
3 vs 4	0,0028
4 vs 5	0,0782
5 vs 6	0,1523
6 vs 7	0,0024
7 vs 8	0,0003
8 vs 9	0,0007
9 vs 10	0,0437
10 vs 13	0,9043

13 vs 14	0,0195
14 vs 15	0,7029

Nota: Los valores menores a P se muestran en negrilla para resaltar las semanas en las que hubo un crecimiento estadísticamente significativo.

En las dos anteriores figuras (13 y 14), se representó la desviación estándar mediante las barras de error. En las cuales, se evidenció, de la misma forma que en la figura 13, que la mayor desviación se encontraba cuando el crecimiento del hongo había sido mayor, llegando a la misma conclusión, el error instrumental y el comportamiento con diferencias significativas de las muestras. Las gráficas de error para estas dos últimas figuras, mostraban la posibilidad de encontrar los datos dentro del rango de dispersión calculado; sin embargo se utilizó la t de student y el ANOVA con el fin de confirmar la diferencia significativa entre los valores de cada semana y apoyar el comportamiento presentado y visualizado en las figuras semana a semana.

Como se pudo observar en las dos curvas de crecimiento realizadas, el comportamiento de una especie, no siempre tiene la misma forma; es decir, no siempre cumple las cuatro fases de la curva de crecimiento de un individuo de forma consecutiva, debido a que puede emplear diversas sustancias en diferentes etapas de su ciclo de vida según la disponibilidad encontrada y la facilidad de descomposición de la sustancia. (Cepero, Restrepo, Franco, Cardenas, & Vargas, 2012).

El crecimiento de los aislamientos no parece significativo si se compara con las pruebas preliminares realizadas; sin embargo, debe recordarse que el cultivo empleado para las curvas de crecimiento era monospórico, mientras que en las pruebas preliminares el

bocado utilizado provenía de más de una espora; por lo que, al parecer es necesario de una mayor población para descomponer el crudo de forma efectiva. Referente a los blancos empleados (solo el MMS con la muestra monospórica) en estas pruebas las masas obtenidas no fueron significativas dentro de los resultados, alcanzando masas similares a las de la semana 0 en cada curva.

Para la elaboración de las gráficas, se realizó una toma de muestra semanal por triplicado; con el fin de mostrar la desviación existente y la confiabilidad entre el grupo de muestras obtenidas por semana. Este triplicado se expresa en las gráficas como barras de error en cada punto graficado. Tanto en las gráficas 13 como en la gráfica 14, se puede observar que el punto en el que se presentó un mayor crecimiento de la muestra, la desviación fue mayor. Esto, puede deberse principalmente al comportamiento y naturaleza propia de cada aislamiento, al error generado por el instrumento de medición (balanza analítica) y/o al error experimental, mostrando mayor dispersión entre más crecimiento se presentaba.

6.3. Biodegradación de otros materiales orgánicos derivados del petróleo crudo por parte de los aislamientos fúngicos

Para el tercer objetivo, una vez conocidas las muestras que fueron capaces de crecer y desarrollarse en el medio con crudo, se escogieron los mejores resultados obtenidos y se pusieron a prueba con materiales orgánicos hidrocarbonados, con el fin de conocer su actividad degradadora en materiales que constituyen residuos de difícil degradación. Por lo que, se seleccionaron los dos aislamientos pertenecientes al género *Aspergillus* sp.; el primero de ellos, denominado como BsBH, debido a su importante capacidad de asimilación cuando es sometida a un alto porcentaje de crudo como sustrato; el

aislamiento denominado LC, al ser en la mayoría de las pruebas con los diferentes porcentajes de crudo, la que mejor resultado mostró de forma constante, y por último, el aislamiento LsC, clasificado en el género *Mucor* sp., al presentar en 3 de las 5 pruebas con los diferentes porcentajes de crudo, el mejor resultado dentro de los géneros probados, después de los aislamientos con los mejores resultados (BsBH y LC). Los materiales hidrocarbonados de difícil degradación con los cuales se llevaron a cabo las pruebas preliminares fueron: llanta (estireno – butadieno SBR), icopor (poliestireno expandido), pañal (polietileno y polipropileno), nylon (poliamida) y espuma (poliuretano). Los resultados se muestran en la figura 15.

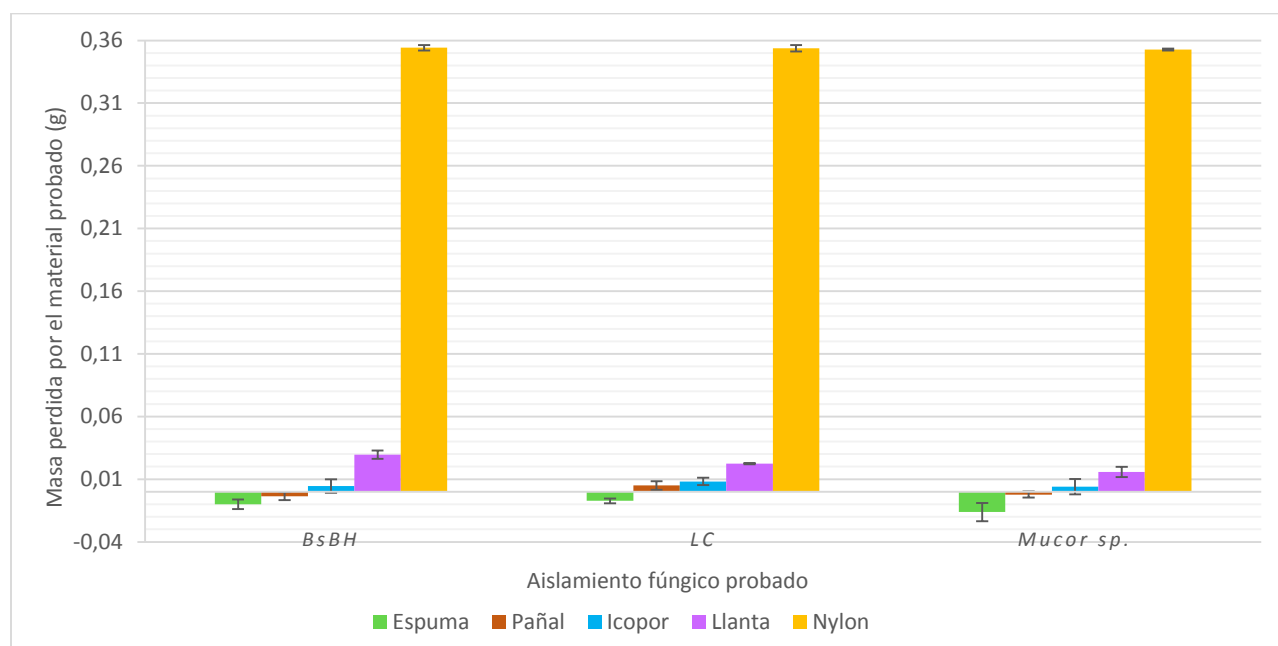


Figura 15. Gráfico de barras comparativo entre los resultados de la prueba de degradación de otros compuestos orgánicos de difícil degradación
Fuente: autora del proyecto.

Los datos de la figura 15, muestran los resultados de las pruebas de degradación en otras matrices, en las cuales, se midió la cantidad de masa perdida por el material probado después del tiempo de incubación. En esta prueba, la mayor pérdida de masa de las matrices puestas a prueba, fue del nylon, en la cual los tres aislamientos BsBH y

LC (pertenecientes al género *Aspergillus* sp.) y LsC (perteneciente al género *Mucor* sp.) presentaron un comportamiento muy similar, reflejado en la pérdida de masa del material probado. Con respecto a la pérdida de masa de la llanta y el icopor, los valores fueron bajos, en los cuales el mejor resultado fue presentado por BsBH para la llanta y por LC para el icopor. La baja pérdida de masa de estas dos últimas matrices, muestra la dificultad presentada para los organismos de efectuar una degradación significativa de estos materiales. La pérdida de masa para la espuma y el pañal parecer ser nula o muy poca, por lo que estos organismos pueden no ser capaces de degradar estos materiales en las condiciones en las que se llevó a cabo el experimento.

La principal sustancia que compone el nylon, son las poliamidas, unidas en cadena larga y con radicales de al menos un 85% alifáticos, cicloalifáticos o aromáticos (Carrion, 2014). Las investigaciones realizadas en materia de degradación de este material, han sido realizadas tanto con bacterias como con hongos. Referente a los hongos que se han registrado capaces de descomponer este material, Tachibana, Hashimoto, Yoshikawa, & Okawa (2010), reportaron la capacidad de *Fusarium* sp., de descomponer el nylon 4, en una prueba realizada durante dos meses cuando se cultivaron en un medio mineral. Friedrich, Zalar, Mohorcic, Klun, & Krzan (2007) reportaron por su parte a *Phanerochaete chrysosporium* y a *Bjerkandera adusta*, como degradadores de nylon 6.

Una de las técnicas empleadas con el fin de disminuir los factores de estrés en las células libres que causan la disminución del crecimiento de los hongos, es la inmovilización; la cual se puede realizar con polímeros como la poliamida (usando el material como el nylon), y de este modo, aumentar la producción de metabolitos que juegan un papel importante en la biodegradación (Tomasini & León, 2015). Los estudios realizados en la

inmovilización de muestras fúngicas para comprobar una mayor producción de metabolitos que ayuden en la biodegradación, ha sido reportada por Hui, Amirul, Yahya, & Azizan (2010) inmovilizando a *A. terreus* y logrando una mayor producción de enzimas celulíticas. León, Meraz, Wrobel, & Tomasini (2011), por su parte, reportaron la inmovilización de *Rhizopus oryzae* para la degradación de pentaclorofenol.

La temática de la inmovilización tratada anteriormente, muestra la posibilidad de emplear esta técnica en consorcios de organismos con el fin de: aumentar la actividad metabólica del consorcio usado, emplear diferentes cepas para potenciar la degradación de compuestos tóxicos y usar cepas capaces de degradar el nylon para disminuir en lo posible todos los compuestos contaminantes que puedan encontrarse en el medio dispuesto, mientras se aprovecha la mejora de la inmovilización con nylon y a su vez se degrada.

Con el fin de conocer las otras sustancias que estos aislamientos parecen ser capaces de degradar, se realizó una revisión bibliográfica encontrando que el género *Mucor* sp., puede degradar benzopireno, caso reportado por Dan, Pei-jun, Stagniti & Xiong (2006), benzoantraceno, reportado por Yongming & Chen (2018) e hidrocarburos de gasóleo, reportado por Marchut-Mikolajczyk, Kwapisz, Wieczorek, & Antczak (2015). Para el caso de *Aspergillus* sp., se conoce que otras matrices capaces de degradar son gasolina y HAP's (Kumar, 2016).

Según la búsqueda realizada, los aislamientos de estos dos géneros probados, son capaces de descomponer sustancias de tipo hidrocarbonadas. Debido a la gran cantidad de formaciones que pueden presentar estas sustancias, se encuentran diversos derivados de los hidrocarburos; uno de ellos son los derivados nitrogenados, los cuales

como su nombre lo indica, se caracterizan por tener al nitrógeno, en el grupo funcional. Dentro de estos derivados nitrogenados, se encuentran las amidas, que como se dijo anteriormente es el grupo funcional principal del nylon (matriz con mayor degradación presentada dentro de las pruebas). Este material, que mostró según las pruebas y según las revisiones bibliográficas ser susceptible de degradación por la acción de hongos, presenta diferentes compuestos que, según lo consultado, pueden ser aprovechados para que estos organismos se desarrollen y efectúen cierta descomposición.

La diversa variedad de ejemplares pertenecientes al dominio Eukarya, refleja las diferentes enzimas y mecanismos desarrollados para descomponer diversas sustancias, mostrando la gran gama de matrices que pueden degradar y las importantes diferencias que tienen para ser capaces o no de sobrevivir en ambientes contaminados con diferentes materiales.

La mejor descomposición de una sustancia puede no solo deberse a fenómenos químicos sino también a fenómenos físicos como mayor contacto del micelio con la sustancia contaminante, adsorción de la sustancia por parte de los hongos, emulsión de aceites o naturaleza de la sustancia como repulsión o atracción a las moléculas del agua (Money, 2016).

Referente a los mecanismos de degradación llevados a cabo por los hongos, se encontró que tienen la capacidad de degradar polímeros insolubles hasta monómeros solubles que puedan consumir; es por ello que son considerados como degradadores natos. Las tres formas más representativas por las cuales un compuesto puede ser degradado son, por vía enzimática, oxidativa, por hidrólisis o la sinergia de éstas, según sea necesario.

Una de las características de estos organismos, es que la alta producción de enzimas ocurre según el sustrato con el que puedan tener contacto. Algunas de las enzimas que se conoce que segregan los hongos son la b-galactosidasa la cual degrada la lactosa, la invertasa, que degrada la sacarosa, la b-glucosidasa que degrada la celobiosa y las peroxidasas y lacasas que degradan parte de la lignina. La vía oxidativa llevada a cabo emplea enzimas junto con la acción del oxígeno para descomponer los compuestos; dentro del grupo de compuestos que se conoce se degradan por esta vía son los aromáticos no fenólicos, por medio de enzimas lignino y manganeso-peroxidasa y las lacasas que catalizan la oxidación de fenoles y aminas aromáticas. Referente al método de hidrólisis, se conoce acerca de la degradación de la cutina, el uso de la enzima cutinasa, las enzimas xilanasa, arabanasa y galactanasa en la disolución de la pared celular (Cepero, Restrepo, Franco, Cardenas, & Vargas, 2012).

Para el caso específico de la degradación de HAP's (componentes presentes en el petróleo), a cargo de *Aspergillus* sp., es conocido que actúa en este proceso dos enzimas, la manganeso-peroxidasa y lignina peroxidasa debido a su similitud estructural con la lignina (Ali, Khalil, & Abd, 2012). Otro método conocido, es la hidroxilación por la enzima monooxigenasa cytP450 (Capotorti, Digianvincenzo, Cesti, Bernardi, & Guglielmetti, 2004). Finalmente, para el caso específico del nylon, se ha reportado la degradación de su membrana por acción de la cepa fúngica IZU-154, por parte de Deguchi, Kitaoka, Kakezawa, & Nishida (1998) en la que se agregó manganeso causando el aumento de la actividad degradadora del hongo; lo cual sugirió, la importante intervención de las enzimas lignolíticas, específicamente de la manganeso-peroxidasa.

7. CONCLUSIONES

- Se aislaron las muestras de hongos de los recipientes que contenían las fibras contaminadas y las fibras solas, y se caracterizaron diecinueve de ellos, pertenecientes a ocho géneros fúngicos diferentes: *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Botrytis* sp., *Chaetomium* sp., *Mucor* sp., *Penicilium* sp., *Phialophora* sp., y *Rhodotorula* sp.; los cuales son encontrados comúnmente en residuos vegetales.
- Se comprobó la actividad degradadora de crudo de los seis aislamientos probados en las pruebas preliminares, dando como mejores resultados los aislamientos BsBH y LC, dos de las especies pertenecientes al género *Aspergillus* sp., seguido del aislamiento perteneciente al género *Mucor* sp., *Chaetomium* sp., *Botrytis* sp., y finalmente por LsVb, especie perteneciente al género *Aspergillus* sp. El comportamiento presentado por cada una de las cepas probadas en la dinámica expuesta en los resultados de las pruebas preliminares, fue apreciablemente diferente; debido probablemente a sus diferencias enzimáticas; hecho que se puede reflejar y respaldar de forma aún más notoria con las diferencias comportamentales de los tres aislamientos pertenecientes al género *Aspergillus* sp.
- Se construyeron las curvas de crecimiento de los aislamientos BsBH y LC del género *Aspergillus* sp., evaluando el comportamiento de estas dos cepas cuando se encontraban expuestas al 15% (p/v) de crudo. El resultado entre el

crecimiento de estas dos especies en las pruebas preliminares y en las curvas de crecimiento, demuestra indiscutiblemente que el mejor crecimiento presentado se observó en la muestra denominada como BsBH, la cual se adapta con buenos resultados a altas concentraciones de esta sustancia; y permite pensar en la gran utilidad de esta especie para su uso en técnicas de biorremediación.

- Se determinó la actividad degradadora de tres aislamientos (*Aspergillus* sp., (BsBH y LC) y *Mucor* sp. (LsC)) en cinco materiales denominados de difícil degradación. Los resultados mostraron la importante pérdida de masa de nylon cuando se encontraba expuesta con los aislamientos probados al llevar a cabo la descomposición de esta matriz. Según la búsqueda bibliográfica realizada de la composición de estas dos matrices (crudo y nylon) se encontró que comparten compuestos alifáticos y aromáticos capaces de descomponer; y que, en la degradación de estas matrices, es probable que intervengan las enzimas lignolíticas como la peroxidasa.
- Se comprobó la capacidad de degradación de crudo por parte de los seis aislamientos fúngicos provenientes de muestras de crudo adsorbidas sobre fibras vegetales mediante cada una de las pruebas realizadas, hallando dos especies pertenecientes al género *Aspergillus* sp.; capaces de desarrollarse y aprovechar este sustrato mientras llevaban a cabo la descomposición del crudo al utilizarlo como fuente de carbono y energía para su crecimiento. De igual modo, se halló la

posibilidad de utilizar los aislamientos BsBH y LC del género *Aspergillus* y el aislamiento LsC del género *Mucor* sp., en medios compuestos con amidas. Los anteriores resultados, muestra la posibilidad de evaluar a profundidad estos tres aislamientos con el fin de desarrollar alternativas para la mitigación de la contaminación del petróleo crudo y sus derivados.

8. RECOMENDACIONES

El presente trabajo, se muestra como la primera investigación realizada en estas muestras fúngicas; y por lo tanto, es la primera aproximación referente al uso de sustancias hidrocarbonadas y derivadas del petróleo, como su sustrato para el crecimiento y desarrollo de estas muestras y hace parte del macroproyecto “Biodegradación de hidrocarburos a partir de aislamientos fúngicos de petróleo, como un acercamiento a la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos”, del que nació el semillero Biodegradación Microbiana de Xenobióticos, con el fin de continuar la investigación del potencial de las muestras obtenidas de las fibras vegetales contaminadas con crudo para la degradación de este tipo de sustancias. Por lo que se sugiere evaluar y adoptar las siguientes recomendaciones para el ejercicio de su investigación:

- Realizar un tratamiento previo en cada matriz a evaluar, es una medida que ofrece grandes ventajas debido a que puede debilitar las paredes del material y aumentar la superficie de contacto entre el organismo y el compuesto.
- Se sugiere el uso de tensoactivos en investigaciones relacionadas con el tema de biorremediación debido al aumento que provoca en la solubilidad de las sustancias, permitiendo un mayor contacto de la población fúngica con los componentes a estudiar.
- La combinación medida de uno o más sustratos con una estructura química sencilla de descomponer; con el fin de aumentar los nutrientes disponibles en el medio y hacer que la población de organismos fúngicos crezca para que exista

una mayor población que ataquen y degraden las sustancias contaminantes deseadas.

- La combinación de diferentes organismos como las bacterias y las plantas con el fin de aprovechar las características que ofrece cada dominio y aumentar la eficiencia de degradación de los diferentes contaminantes.
- Evaluar el comportamiento de las diferentes muestras a emplear, variando factores físicoquímicos como pH, temperatura, nutrientes, entre otros, con el fin de conocer las condiciones en el que cada aislamiento se desarrolla mejor.
- De acuerdo con la consulta realizada acerca de las enzimas empleadas para realizar la degradación de los compuestos hidrocarbonados, se sugiere complementar el MMS dispuesto para las pruebas, con manganeso, con el fin de aumentar la posibilidad de realizar de forma más efectiva la degradación de los compuestos a probar, ya que se ha visto el uso de la enzima manganeso-peroxidasa en la descomposición de algunos hidrocarburos del petróleo.

9. Bibliografía

- Aleu, J., & González, I. (2001). Biotransformations by *Botrytis* species. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 77-93.
- Ali, M., Khalil, N., & Abd, M. (2012). Biodegradation of some polycyclic aromatic hydrocarbons by *Aspergillus terreus*. *African Journal of Microbiology Research*, 3783-3790.
- Arenas, R. (2014). *Micología médica ilustrada* (Quinta ed.). México D.F.: McGraw-Hill Interamericana editores S.A. de C.V.
- Arias, E., & Piñeros, P. (Junio de 2008). *Alislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los paramos de Guasca y Cruz Verde*.
Obtenido de Universidad Javeriana:
<http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis226.pdf>
- Blanco, J. (20 de Noviembre de 2015). *Derivados del petróleo y su uso en la vida cotidiana*. Obtenido de Escuela Técnica Especializada en Ingeniería, Arquitectura y Construcción: <http://www.eadic.com/derivados-del-petroleo-y-su-uso-en-la-vida-cotidiana/>
- Bonifaz, A. (2012). *Micología médica básica* (Cuarta ed.). México D.F.: McGraw-Hill.
- Boullosa, N. (16 de Febrero de 2010). *Micelios: hongos para salvar al mundo (y al ser humano)*. Obtenido de faircompanies: <https://faircompanies.com/articles/micelios-hongos-para-salvar-al-mundo-y-al-ser-humano/>

- Cañedo, V. A. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*.
Lima: Centro Internacional de la papa.
- Capotorti, G., Digianvincenzo, P., Cesti, P., Bernardi, A., & Guglielmetti, G. (2004).
Pyrene and benzo(a)pyrene metabolism by an *Aspergillus terreus* strain isolated
from a polycyclic aromatic hydrocarbons polluted soil. *Biodegradation*, 79-85.
- Cardona, M., Osorio, J., & Quintero, J. (Junio de 2009). Degradación de colorantes
industriales con hongos lignolíticos. *Facultad de Ingeniería Universidad de
Antioquía*(48), 27-37.
- Carrion, F. (2014). *Universitat politecnica de catalunya*. Obtenido de Materias téxtiles.
Poliamida.
- Castells, X. (2012). *Energía, agua, medioambiente, territorialidad y sostenibilidad*.
Madrid: Díaz de Santos S.A.
- Castells, X., & Velo, E. (2012). *La gasificación: Tratamiento y valorización energética de
residuos*. Madrid: Díaz de Santos.
- Castillo, F. (2005). *Biotecnología ambiental*. Madrid, España: Tebar, S.L.
- Cepero, M., Restrepo, S., Franco, A., Cardenas, M., & Vargas, N. (2012). *Biología de
hongos*. Bogotá: Uniandes.
- Chaudhary, D., & Kim, J. (2019). New insights into bioremediation strategies for oil-
contaminated soil in cold environments. *International Biodeterioration &
Biodegradation*, 58-72.

- Cruz, M., & Alcalá, G. (2007). *La contaminación de suelos y aguas. Su prevención con nuevas sustancias naturales*. España: Secretariado de publicaciones de la Universidad de Sevilla.
- Dan, S., Pei-jun, L., Stagnitti, F., & Xiong, X.-z. (2006). Biodegradation of benzo(a)pyrene in soil by *Mucor* sp. and *Bacillus* sp. SB02 co-immobilized on vermiculite. *Journal of Environmental Science*, 1204-1209.
- Deguchi, T., Kitaoka, Y., Kakezawa, M., & Nishida, T. (1998). Purification and characterization of a nylon-degrading enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1366-1371.
- Domsch, K., Gams, W., & Anderson, T. (2007). *Compendium of soil fungi* (Segunda ed.). London: IHW-Verlag.
- Duarte, C. (2010). *Océano El secreto del planeta tierra*. España: CSIC.
- Ezekoye, C., Chikere, C., & Okpokwasili, G. (2018). Fungal diversity associated with crude oil-impacted soil undergoing in-situ bioremediation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 148-152.
- Friedrich, J., Zalar, P., Mohorcic, M., Klun, U., & Krzan, A. .. (2007). Ability of fungi to degrade synthetic polymer nylon-6. *Chemosphere*, 2089-2095.
- Gallardo, C. (2004). *Control Químico Y Estudio De La Diseminación De En Huertos Comerciales De Babaco En Los Valles De Tumbaco Y Los Chillos*. Quito, Ecuador: INIAP Universidad Central de Ecuador.

- Gamazo, C., López, I., & Díaz, R. (2010). *Manual práctico de Microbiología*. Madrid: Elsevier.
- Gao, H., Zhang, J., Lai, H., & Xue, Q. (2017). Degradation of asphaltenes by two *Pseudomonas aeruginosa* strains and their effects on physicochemical properties of crude oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 12-22.
- García, M. (2005). *Los hidrocarburos policíclicos aromáticos asociados a combustibles fósiles. Caracterización, análisis y remediación*. Madrid.
- García, R., Rios, E., Martínez, á., Ramos, F., Cruz, J., & Cuvas, M. (2011). Uso de cachaza y bagazo de caña de azúcar en la remoción de hidrocarburos en suelo contaminado. *Internacional de contaminación ambiental*, 27(1), 31-39.
- García, V. (2004). *Introducción a la microbiología* (Segunda ed.). San Jose, Costa Rica: EUNED.
- Gimeno, A. (5 de Abril de 2002). *Principales factores condicionantes para el desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas* . Obtenido de Ergomix: <https://www.engormix.com/micotoxinas/articulos/principales-factores-condicionantes-desarrollo-t26065.htm>
- Greenpeace. (2009). *Bolsa "Biodegradables"*. Obtenido de senado.gov: <http://www.senado.gov.ar/upload/8739.pdf>
- Hamzah, A., Manikan, V., & Fathiha, N. (2017). Biodegradation of Tapis Crude Oil Using Consortium of Bacteria and Fungi: Optimization of Crude Oil Concentration and Duration of Incubation by Response Surface Methodology. *Sains Malaysiana*, 43-50.

- Hernández, A. (2003). *Microbiología Industrial*. San Jose, Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia.
- Hernandez, E., Gutiérrez, M., Rubiños, J., & Alvarado, J. (2006). Caracterización del suelo y plantas de un sitio contaminado con hidrocarburos. *Terra Latinoamericana*, 24(4), 463-470.
- Hernández, E., Rubiños, J., & Alvarado, J. (2004). *Restauración de suelos contaminados con hidrocarburos: conceptos básicos*. Obtenido de ReaseahGate GmbH: https://www.researchgate.net/profile/Elizabeth_Acosta2/publication/272679969_Restauracion_de_suelos_contaminados_con_hidrocarburos_Conceptos_Basicos/links/54ed1e60cf28f3e65355938/Restauracion-de-suelos-contaminados-con-hidrocarburos-Conceptos-Basicos.pdf
- Hui, Y., Amirul, A., Yahya, A., & Azizan, M. (2010). Cellulase production by free and immobilized *Aspergillus terreus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 79-84.
- Janbandhu, A., & Fulekar, M. (2011). Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *Journal of Hazardous Materials*, 333-340.
- Jiménez, R. (2017). *Introducción a la contaminación de suelos*. Madrid: Mundi-Mrensa.
- Jung, E., Jin, H., & Heon, K. (2016). Synergism of an auxiliary activity 9 (AA9) from *Chaetomium globosum* with xylanase on the hydrolysis of xylan and lignocellulose. *Process Biochemistry*, 1445-1451.

- Khan, S., Nadir, S., Ullah, Z., Ali, A., Karunaranthna, S., Xu, J., y otros. (2017). Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*. *Environmental Pollution*, 1-12.
- Kovacec, E., Regvar, M., Teun, J., Arcon, I., Papp, T., Makovec, D., y otros. (2017). Biotransformation of copper oxide nanoparticles by the pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Chemosphere*, 178-185.
- Kumar, V. (2016). *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. New Delhi: Elsevier Science.
- Lalucat, J., Cladera, A., & García, E. (2015). Biodegradación de crudo de petróleo en el mar: accidente del Prestige y aportaciones de la biotecnología ambiental. *Sociedad Española de Microbiología*, 35(9), 3.
- Latha, R., & Kalaivani, R. (2012). Bacterial Degradation of Crude Oil by Gravimetric Analysis. *Advances in Applied Science Research*, 2789-2795.
- Lazcano, C. (2014). *Biotecnología ambiental de aguas y aguas residuales*. Lima, Perú: Fondo de la UNMSM.
- León, H., Meraz, M., Wrobel, K., & Tomasini, A. (2011). Pentachlorophenol sorption in nylon fiber and removal by immobilized *Rhizopus oryzae* ENHE. *Journal of Hazardous Materials*, 707-712.
- Li, L., Li, W., Song, W., & Guo, M. (15 de Agosto de 2018). Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: Principles and applicability. *Science of The Total Environment*, 633, 206-219.

- López, G. (2003). *Impacto ambiental por las actividades extractivas en bosques tropicales*. Obtenido de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: <http://www.fao.org/docrep/ARTICLE/WFC/XII/1026-B4.HTM>
- Lozano, N. (2005). Biorremediación de ambientes contaminados con petróleo. (J. Lizcano, Ed.) *Tecnogestión*, 2(1), 1-1.
- Lufke. (14 de Mayo de 2013). *Creative commons*.
- M.H., B., Guillen, A., & Abreu, J. (2016). Energías Renovables y Conservación de Energía. *International Journal of Good Conscience*, 141-155.
- Macías, A., Mera, L., Espinoza, M., Vite, F., Vallejo, P., Mendoza, L., y otros. (2019). *Microbiología y salud*. Área de innovación y desarrollo S.L.
- Manai, I., Miladi, B., El Mselmi, A., Smaali, I., Hassen, A., Hamdi, M., y otros. (2016). Industrial textile effluent decolourization in stirred and static batch cultures of a new fungal strain *Chaetomium globosum* IMA1 KJ472923. *Journal of environmental management*, 8-14.
- Marchut-Mikolajczyk, O., Kwapisz, E., Wieczorek, D., & Antczak, T. (2015). Biodegradation of diesel oil hydrocarbons enhanced with *Mucor circinelloides* enzyme preparation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 142-148.
- Martín, C., González, A., & Blanco, M. (2004). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Revista Iberoamericana Micol*, 103-120.

- Mier, T., Toriello, C., & Ulloa, M. (2002). *Hongos microscópicos saprobios y parásitos: métodos de laboratorio*. México, D.F.: División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UNAM.
- Mondino, P. (2012). *Métodos de aislamiento*. Obtenido de Facultad de Agronomía Universidad de la República: <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursometodosfito/05-Metodos%20de%20aislamiento.pdf>
- Money, N. (2016). Fungi and Biotechnology. *The fungi*, 401-424.
- Obafemi, Y., Taiwo, O., Omodara, O., Dahunsi, O., & Oranusi, S. (2018). Biodegradation of crude petroleum by bacterial consortia from oil-contaminated soils in Ota, Ogun State, South-Western, Nigeria. *Environmental Technology & Innovation*, 230-242.
- Omil, B. (21 de Mayo de 2007). *Gestión de cenizas como fertilizante y enmendante de plantaciones jóvenes de Pinus Radiata*. Costa Rica: Universidad de Santiago de Compostela.
- Omokhagbor, G., Prekeyi, F., Samson, O., & Igelenyah, E. (2015). Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 28-39.
- Onyekweli, B. (2003). Biodegradation of wood in crude oil-polluted soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 799-804.
- Ortínez, O., Ize, B., & Gavilán, A. (2003). La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta Ecológica*, 83-92.

- Parra, E. (2003). *Petróleo y gas natural: industrias, mercados y precios*. Madrid, España: Akal, S.A.
- Patín, S. (2013). Environmental Impact of Crude Oil Spills. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*.
- Pineda, O. (2010). La química aplicada y la elaboración del petróleo colombiano. *Universidad Nacional*(3), 375-384.
- Riser-Roberts, E. (1998). *Remediation of Petroleum Contaminated Soils*. CRC Press.
- Rivera, M., Ferrera, R., Volke, V., Rodríguez, R., & Fernández, L. (2002). Adaptación y selección de microorganismos autoctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra Latinoamericana*, 423-434.
- Rodríguez, J., & Sanchez, J. (2003). Aspectos tecnológicos y aplicación al vertido de Prestige Biorremediación. *Consejo Superior de Colegios de Ingenieros de Minas*, 17-21.
- Ron, E., & Rosenberg, E. (2014). Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. *Current Opinion in Biotechnology*, 191-194.
- Rosenberg, E., & Ron, E. (1996). *Biorremediation of petroleum contamination* (Vol. VI). (J. Lynch, Ed.) New York: Cambridge University.
- Roy, A., Baruah, R., Borah, M., Singh, A., Deka, H., Saikia, N., y otros. (2014). Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 79-89.

- Sadava, D., Heller, C., Orians, G., Purves, B., & Hillis, D. (2009). *Vida la ciencia de la biología* (Octava ed.). Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana, S.A.C.F.
- Samakshi, B., & Kuila, A. (2019). Bioremediation of heavy metals by microbial process. *Environmental Technology & Innovation*.
- Silva, M., García, M., Del Castillo, L., Ania, J., & Gómez, D. (2006). *Técnico especialista en Laboratorio*. España: Mad S.L.
- Smith, J. (2004). *Biotecnología*. Zaragoza, España: Acribia S.A.
- Solanas, A. (18-20 de Noviembre de 2009). La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. *ReseachGate*, IX, 8.
- Speight, J. (2014). *The Chemistry and Technology of Petroleum* (Quinta ed.). Florida: Taylor & Francis Group.
- Speight, J., & Shafik, N. (2018). Petroleum Composition and Properties. En J. Speight, & N. Shafik, *Introduction to Petroleum Biotechnology* (págs. 1-39).
- Tachibana, K., Hashimoto, K., Yoshikawa, M., & Okawa, O. (2010). Isolation and characterization of microorganisms degrading nylon 4 in the composted soil. *Polymer Degradation and Stability*, 912-917.
- Timmis, K. (2010). *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Braunschweig: Springer.
- Tomasini, A., & León, H. (2015). Nylon uses in biotechnology. *Biocomposites*, 319-346.

- Torres, K., & Zuluaga, T. (2009). *Biorremediación de suelo contaminados por hidrocarburos*. Obtenido de Biblioteca Digital Universidad Nacional: http://www.bdigital.unal.edu.co/815/1/32242005_2009.pdf
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología* (Novena ed.). Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana S.A.
- Valderrama, B. (2000). *Microbiología del petróleo y sus derivados*. (E. Martinez, & J. Martínez, Edits.) México, D.F: Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno.
- Varjani, S. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 277-286.
- Volke, T. (2002). Biorremediación de suelos contaminados. *Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*, VII(1), 24-39.
- Yemashova, N., Murygina, V., Zhukov, D., Zakharyantz, A., Gladchenko, M., Appanna, V., y otros. (2007). Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. *Environ Sci Biotechnol*, 315-337.
- Yongming, L., & Chen, T. (2018). *Twenty years of research and development on soils pollution and remediation in China*. Yantai: Science Press & Springer Nature.
- Yuan, X., Zhang, X., Chen, X., Kong, D., Liu, X., & Shen, S. (2018). Synergistic degradation of crude oil by indigenous bacterial consortium and exogenous fungus *Scedosporium boydii*. *Bioresource Technology*, 190-197.

Zhao, P., Xue, Y., Li, X., Li, J., Zhao, Z., Quan, C., y otros. (2019). Fungi-derived lipopeptide antibiotics developed since 2000. *Peptides*, 52-65.

10. ANEXOS

En esta sección se mostrarán las tablas de datos con las que se construyeron las figuras 12 a 15 del documento y que se muestran en la sección de resultados y discusión.

Anexo 1

Tabla de datos de las pruebas preliminares de degradación de crudo (datos correspondientes a la figura 12).

% Crudo	Género	Masa promedio ganada (g)	Desviación
15	<i>Aspergillus</i> sp. (BsBH)	0,150	0,015
	<i>Aspergillus</i> sp. (LC)	0,089	0,000
	<i>Mucor</i> sp.	0,046	0,003
	<i>Chaetomium</i> sp.	0,030	0,007
	<i>Botrytis</i> sp.	0,036	0,011
	<i>Aspergillus</i> sp. (LsVb)	0,022	0,002
10	<i>Aspergillus</i> sp. (BsBH)	0,042	0,000
	<i>Aspergillus</i> sp. (LC)	0,038	0,001
	<i>Mucor</i> sp.	0,004	0,001
	<i>Chaetomium</i> sp.	0,013	0,001
	<i>Botrytis</i> sp.	0,034	0,005
	<i>Aspergillus</i> sp. (LsVb)	0,013	0,005
5	<i>Aspergillus</i> sp. (BsBH)	0,022	0,003
	<i>Aspergillus</i> sp. (LC)	0,042	0,010
	<i>Mucor</i> sp.	0,005	0,002
	<i>Chaetomium</i> sp.	0,020	0,005
	<i>Botrytis</i> sp.	0,019	0,003
	<i>Aspergillus</i> sp. (LsVb)	0,010	0,001

2	<i>Aspergillus</i> sp. (BsBH)	0,002	0,000
	<i>Aspergillus</i> sp. (LC)	0,038	0,011
	<i>Mucor</i> sp.	0,027	0,001
	<i>Chaetomium</i> sp.	0,021	0,013
	<i>Botrytis</i> sp.	0,018	0,001
	<i>Aspergillus</i> sp. (LsVb)	0,006	0,003
1	<i>Aspergillus</i> sp. (BsBH)	0,007	0,001
	<i>Aspergillus</i> sp. (LC)	0,054	0,005
	<i>Mucor</i> sp.	0,015	0,000
	<i>Chaetomium</i> sp.	0,013	0,002
	<i>Botrytis</i> sp.	0,010	0,003
	<i>Aspergillus</i> sp. (LsVb)	0,005	0,002

Fuente: autora del proyecto.

Anexo 2

Tabla de datos del crecimiento de los blancos de cada aislamiento realizado en las pruebas preliminares de degradación de crudo (datos correspondientes a la figura 12).

% Crudo (Blancos)	Género	Masa promedio ganada (g)	Desviación
0	<i>Aspergillus</i> sp. (BsBH)	0,003	0,002
	<i>Aspergillus</i> sp. (LC)	0,005	0,001
	<i>Mucor</i> sp.	0,008	0,001
	<i>Chaetomium</i> sp.	0,003	0,002
	<i>Botrytis</i> sp.	0,003	0,003
	<i>Aspergillus</i> sp. (LsVb)	0,007	0,002
15	-	0,007	0,001
10	-	0,001	0,000
5	-	0,002	0,001
2	-	-0,001	0,001

1	-	-0,008	0,001
---	---	--------	-------

Fuente: autora del proyecto.

Anexo 3

Tabla de datos de crecimiento del aislamiento LC para la construcción de la curva de crecimiento (datos correspondientes a la figura 13).

Semana	Masa promedio ganada (g)	Desviación
1	0,007	0,001
2	0,011	0,001
3	0,012	0,002
4	0,013	0,001
5	0,014	0,001
6	0,017	0,001
9	0,012	0,003
10	0,009	0,002
11	0,021	0,004
12	0,011	0,002
13	0,011	0,002
14	0,007	0,001
15	0,006	0,001

Fuente: autora del proyecto.

Anexo 4

Tabla de datos del crecimiento de los blancos del aislamiento LC para la construcción de la curva de crecimiento (datos correspondientes a la figura 13).

Semana	Crecimiento blanco (g)
3	0,001
6	0,002

9	-0,003
12	0,004
15	0,004

Fuente: autora del proyecto.

Anexo 5

Tabla de datos del crecimiento del aislamiento BsBH para la construcción de la curva de crecimiento (datos correspondientes a la figura 14).

Semana	Masa promedio ganada (g)	Desviación
1	0,035	0,002
2	0,038	0,002
3	0,042	0,003
4	0,025	0,002
5	0,029	0,001
6	0,032	0,002
7	0,059	0,005
8	0,015	0,002
10	0,028	0,001
13	0,028	0,004
14	0,014	0,004
15	0,018	0,003

Fuente: autora del proyecto.

Anexo 6

Tabla de datos del crecimiento de los blancos del aislamiento BsBH para la construcción de la curva de crecimiento (datos correspondientes a la figura 14).

Semana	Crecimiento del blanco (g)
1	0,006

3	0,015
5	0,009
7	0,006
9	0,014
10	0,010
13	0,008
14	0,005
15	0,011

Fuente: autora del proyecto.

Anexo 7

Tabla de datos de la pérdida de masa de otras matrices (datos correspondientes a la figura 15).

Matriz	Género	Masa perdida de la matriz (g)	Desviación
Nylon	<i>Aspergillus</i> sp. (BsBH)	0,3543	0,0022
	<i>Aspergillus</i> sp. (LC)	0,3538	0,0026
	<i>Mucor</i> sp.	0,3528	0,0008
Llanta	<i>Aspergillus</i> sp. (BsBH)	0,0295	0,0033
	<i>Aspergillus</i> sp. (LC)	0,0225	0,0005
	<i>Mucor</i> sp.	0,0158	0,0040
Icopor	<i>Aspergillus</i> sp. (BsBH)	0,0045	0,0054
	<i>Aspergillus</i> sp. (LC)	0,0082	0,0029
	<i>Mucor</i> sp.	0,0040	0,0060
Pañal	<i>Aspergillus</i> sp. (BsBH)	-0,0035	0,0032
	<i>Aspergillus</i> sp. (LC)	-0,0050	0,0034
	<i>Mucor</i> sp.	-0,0022	0,0025
Espuma	<i>Aspergillus</i> sp. (BsBH)	-0,0100	0,0039
	<i>Aspergillus</i> sp. (LC)	-0,0072	0,0019

<i>Mucor sp.</i>	-0,0163	0,0073
------------------	---------	--------

Fuente: autora del proyecto.

Anexo 8

Tabla de datos de la masa inicial añadida para cada matriz (datos correspondientes a la figura 15).

Matriz	Masa inicial añadido (g)
Llanta	3,6
Nylon	0,39
Icopor	0,5
Espuma	0,2
Pañal	0,075

Fuente: autora del proyecto.

Anexo 9

Tabla de datos del crecimiento promedio del blanco de los aislamientos puestos a prueba en las pruebas con otras matrices (datos correspondientes a la figura 15).

Género	Crecimiento promedio del blanco (g)
<i>Aspergillus sp. (BsBH)</i>	0,003
<i>Aspergillus sp. (LC)</i>	0,008
<i>Mucor sp.</i>	0,008

Fuente: autora del proyecto.